

# Molekulargenetische Untersuchungen bei uro-rektalen Fehlbildungen

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Markus Draaken**

aus

Krefeld

Bonn (April 2013)

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus M. Nöthen

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hoch

Tag der Promotion: 17.09.2013

Erscheinungsjahr: 2014

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1    Einleitung .....	1
1.1  Untersuchte uro-rektale Fehlbildungen.....	1
1.1.1  Blasenektrophie-Epispadie-Komplex (BEEK).....	1
1.1.1.1  Isolierte Epispadie (E) .....	1
1.1.1.2  Klassische Blasenektrophie (KBE).....	2
1.1.1.3  Kloakenektrophie (KE).....	3
1.1.1.4  Embryologie des BEEK .....	4
1.1.1.5  Epidemiologie des BEEK.....	5
1.1.1.6  Genetik des BEEK.....	6
1.1.2  Anorektale Malformationen (ARM).....	11
1.1.2.1  VATER/VACTERL-Assoziation .....	12
1.1.2.2  Prune-Belly-Syndrom (PBS).....	13
1.1.2.3  Embryologie der ARM.....	15
1.1.2.4  Epidemiologie der ARM.....	15
1.1.2.5  Genetik der ARM allgemein .....	16
1.2  Systematische Identifizierung von kausalen Genen und Regionen bei seltenen angeborenen uro-rektalen Fehlbildungen .....	17
1.2.1  Untersuchungen zu ursächlichen Kopienzahlveränderungen (CNV- Analysen) .....	18
1.2.2  Next Generation Sequencing (NGS).....	20
1.3  Netzwerk für kongenitale uro-rektale Fehlbildungen (CURE-Net) .....	22
2    Zielsetzung.....	23
3    Material und Methoden.....	24

---

3.1	Verwendete Materialien .....	24
3.1.1	Geräte .....	24
3.1.2	Chemikalien und Enzyme .....	27
3.1.3	Lösungen .....	28
3.1.4	Kommerzielle Systeme (Kits) .....	28
3.1.5	Software und Datenbanken .....	29
3.2	Molekularbiologische Untersuchungen .....	31
3.2.1	Isolierung genomischer DNA und RNA .....	31
3.2.2	Konzentrations- und Reinheitsmessung .....	32
3.2.3	Fällung von verunreinigter DNA .....	33
3.2.4	Genomweite SNP-Array Genotypisierung mit Illumina .....	33
3.2.5	Multiplex ligations-abhängige Sondenamplifikation (MLPA) .....	35
3.2.6	Auswahl der Oligonukleotidsequenzen (Primer-Design) .....	36
3.2.7	DNA-Amplifikation (Polymerase-Kettenreaktion; PCR) .....	37
3.2.7.1	PCR-Reaktionsansätze .....	37
3.2.7.2	PCR-Reaktionsbedingungen .....	38
3.2.7.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	39
3.2.8	Quantitative PCR (qPCR) .....	40
3.2.8.1	qPCR-Reaktionsansatz und -bedingungen .....	40
3.2.8.2	Schmelzkurve .....	41
3.2.8.3	Auswertung $\Delta\Delta C_t$ -Methode .....	41
3.2.9	Automatisierte Sanger-Sequenzierung .....	42
3.2.9.1	Probenvorbereitung und Primer für die Sanger-Sequenzierung .....	43
3.2.9.2	Sanger-Sequenzierungsansatz und -Reaktionsbedingungen .....	43
3.2.9.3	Vorbereitung, Auftrennung und Verarbeitung der Sequenzierfragmente .....	44
3.2.10	Next Generation Sequencing (NGS) .....	44
3.2.10.1	Roche 454 GenomeSequencer FLX (GS-FLX) Titanium Instrument ....	45
3.2.10.2	Illumina (Solexa) Genome Analyzer (GA) .....	46
3.2.10.3	Applied Biosystems (ABI) SOLiD System .....	47
3.2.11	Ganzpräparat <i>in situ</i> Hybridization (WISH) .....	47

---

3.2.12	Powerplex® 16-System zur Bestätigung der Elternschaft.....	48
3.2.13	Auswahl der Verifikationsmethoden .....	48
3.3	Bioinformatische und statistische Methoden.....	49
3.3.1	GenomeStudio (GS) .....	49
3.3.1.1	B-Allel Frequenz (BAF) .....	49
3.3.1.2	Log-R-Ratio (LRR) .....	50
3.3.1.3	CNV Detektion in GS.....	50
3.3.1.4	Ermittlung der Abstammung in GS .....	51
3.3.2	Genomweite Detektion von CNVs mittels QuantiSNP .....	52
3.3.3	Einschätzung der biologischen Relevanz von CNVs.....	53
3.3.3.1	Nicht öffentlich zugängliche interne Kontrollkollektive .....	53
3.3.3.2	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER).....	54
3.3.3.3	Database of Genomic Variants (DGV) .....	54
3.3.3.4	University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser .....	54
3.3.3.5	Mouse Genome Informatics (MGI) Datenbank.....	55
3.3.4	Cartagenia Bench™ Software (Cartagenia).....	55
3.3.5	Auswertung und computerbasierte Analyse der NGS Daten.....	56
3.3.6	Prädiktionsprogramm (PS) <sup>2</sup> -v2 zur Vorhersage der Proteinstruktur .....	56
3.3.7	Prädiktionsprogramme zur Interpretation detektierter Varianten .....	56
3.4	Durchführung der Analysen.....	57
3.5	Filterkriterien für die CNV-Analyse .....	57
4	Ergebnisse.....	62
4.1	Genetische Untersuchungen bei Patienten mit Blasenektrophie-Epispadie- Komplex (BEEK) .....	62
4.1.1	Analysen der Kopienzahlveränderungen bei BEEK.....	62
4.1.1.1	Duplikationen auf Chromosom 22 .....	62
4.1.1.2	Duplikation auf Chromosom 19 .....	66
4.1.1.3	CNV-Analyse in acht konsanguinen iranischen Familien.....	70

4.1.2	Sequenzierungsanalysen .....	72
4.1.2.1	NGS Analysen bei Duplikationen auf Chromosom 22.....	73
4.1.2.2	NGS Analyse einer konsanguinen marokkanischen Familie.....	76
4.1.2.3	Kandidatengenanalyse für <i>CYR61</i> .....	79
4.1.2.4	Kandidatengenanalyse für <i>WIZ</i> .....	80
4.1.2.5	Kandidatengenanalyse für <i>SNAP29</i> und <i>CRKL</i> .....	83
4.2	Genetische Untersuchungen bei Patienten mit isolierter anorektaler Malformation (ARM).....	84
4.2.1	Analysen der Kopienzahlveränderungen bei ARM.....	85
4.2.1.1	Duplikation auf Chromosom 18 .....	85
4.2.1.2	Deletion 18q-Syndrom.....	86
4.2.2	Kandidatengenanalyse für ausgewählte Gene der WNT- und FGF- Signalwege.....	88
4.3	Genetische Untersuchungen bei Patienten mit VATER/VACTERL-Assoziation .....	92
4.4	Genetische Untersuchungen bei Patienten mit Prune-Belly-Syndrom (PBS).....	95
5	Diskussion .....	98
5.1	Blasenektrophie-Epispadie-Komplex (BEEK) .....	98
5.1.1	Duplikation auf Chromosom 22 .....	98
5.1.2	Duplikation auf Chromosom 19 und <i>WIZ</i> als Kandidatengen .....	101
5.1.3	<i>ALDH1A2</i> (CNV Analyse in acht iranischen konsanguinen Familien) .....	102
5.1.4	NGS-Analyse einer konsanguinen marokkanischen Familie ( <i>TTLL3</i> ) .....	103
5.1.5	Kandidatengenanalyse für <i>CYR61</i> .....	105
5.2	Isolierte anorektale Malformation (ARM).....	106
5.2.1	Duplikation auf Chromosom 18 .....	106
5.2.2	Deletion-18q-Syndrom.....	106
5.2.3	Ausgewählte Kandidatengene der WNT- und FGF-Signalwege.....	107
5.3	VATER/VACTERL-Assoziation.....	110
5.4	Prune-Belly-Syndrom (PBS) .....	111

---

6	Zusammenfassung .....	114
7	Ausblick.....	118
	Literaturverzeichnis.....	120
	Eigene Publikationen .....	149
	Anhang.....	152
	Danksagung .....	160
	Eidesstattliche Versicherung .....	162

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

Abb. 1: Männliches (A) und weibliches (B) Neugeborenes mit Epispadie (Ebert et al., 2009) .....	2
Abb. 2: Männliches (A) und weibliches (B) Neugeborenes mit klassischer Blasenekstrophie (Ebert et al., 2009) .....	3
Abb. 3: Männliches Neugeborene mit Kloakenekstrophie (Ebert et al., 2009) .....	4
Abb. 4: Formen der isolierten anorektalen Malformation .....	12
Abb. 5: Klassisches Erscheinungsbild des Abdomens bei einem neugeborenen Jungen mit PBS (Hassett et al., 2012).....	13
Abb. 6: GenomeStudio Darstellung von Chromosom 5 ohne Kopienzahlveränderung ....	51
Abb. 7: CNV-Filterschritte von der Genotypisierung bis zur Kandidatenregion .....	58
Abb. 8: Mikroduplikation 22q11.21 bei Patient 27-501 .....	63
Abb. 9: MLPA-Ergebnis mit Mikroduplikation 22q11.21 .....	64
Abb. 10: Übersicht der Mikroduplikationen 22q11.21 nach Array-Analyse und der involvierten Gene.....	66
Abb. 11: Mikroduplikation 19p13.12 nach Draaken et al. (2013).....	68
Abb. 12: Mikrodeletion 15q22.1 .....	72
Abb. 13: Abdeckung der abgeglichenen NGS-Sequenzen von Patient 27-501 auf Chromosom 22.....	74
Abb. 14: Acht Mikroduplikationen 22q11.21 nach NGS- und Array-Analyse.....	75
Abb. 15: Stammbaum der konsanguinen marokkanischen Familie .....	76
Abb. 16: WISH- Expressionsanalyse von <i>Ttll3</i> .....	77
Abb. 17: WISH- Expressionsanalyse von <i>Cyr61</i> nach Draaken et al. (2010a).....	79
Abb. 18: WISH-Expressionsanalyse von <i>Wiz</i> nach Draaken et al. (2013) .....	82
Abb. 19: Überlappende Mikroduplikationsregion auf Chromosom 22 in acht KBE-Patienten .....	83
Abb. 20: Duplikation 18p11.21-q12.1 nach Schramm et al. (2010) .....	86
Abb. 21: Kariogramm und FISH-Analyse beim Patienten mit 18q-Deletionssyndrom nach Bartels et al. (2011).....	87
Abb. 22: Aberrationen auf Chromosom 18 nach Bartels et al. (2011).....	88
Abb. 23: WISH-Expressionsanalyse von <i>Eppk1</i> und <i>Gpr35</i> nach Hilger et al. (in Druck). 94	



Abb. 24: Schematische Darstellung und NGS- bzw. Sanger-Sequenzierungsergebnis für die homozygote <i>CHRM3</i> Frameshift-Mutation nach Weber et al. (2011).....	96
Abb. 25: Moduliertes 3D-Modell der CHRM3-Proteinstruktur nach Weber et al. (2011).....	97
Abb. 26: Mikrodeletion 15q22.1 in <i>ALDH1A2</i> .....	103
Abb. 27: Abstrahierte Darstellung von Signaltransduktionen ausgewählter FGF-/WNT-Proteine nach Draaken et al. (2012) .....	108
Abb. 28: Stammbaum der konsanguinen Familie mit dem PBS-Indexpatienten.....	112

## Tabellen

Tab. 1: Vorbeschriebene numerische Chromosomenaberrationen bei BEEK-Patienten....	7
Tab. 2: Vorbeschriebene strukturelle Defekte bei BEEK-Patienten .....	7
Tab. 3: PBS-Klassifizierung nach (Woodard, 1978).....	14
Tab. 4: Technische Details der verwendeten SNP-Arrays.....	35
Tab. 5: PCR-Reaktionsansätze für unterschiedliche <i>Taq</i> -Polymerasen .....	37
Tab. 6: Standard-PCR-Programm TD100 .....	38
Tab. 7: PCR-Programm CN Hot.....	38
Tab. 8: PCR Programm CN (temperatur- und größenspezifisch) .....	38
Tab. 9: Primer3-Parameter zur Auswahl der qPCR Primer-Paare.....	40
Tab. 10: 10 µl qPCR-Reaktionsansatz mit SYBR Green.....	41
Tab. 11: Sanger-Sequenzierungsansatz .....	43
Tab. 12: Standardbedingungen für die „cycle-sequencing“-Reaktion .....	44
Tab. 13: Vergleich der drei verwendeten am Markt dominierenden NGS-Technologien .....	44
Tab. 14: Übersicht der sechs KBE-Patienten mit Mikroduplikationen auf Chromosom 22q11.12 .....	65
Tab. 15: Übersicht der Mikroduplikationsregion auf Chromosom 22q11.21 identifiziert mittels SNP-Array in sechs KBE-Patienten .....	65
Tab. 16: qPCR Ergebnisse der gefilterten CNV-Befunde in 110 BEEK-Patienten.....	67
Tab. 17: RefSeq-Gene in der Duplikationsregion auf Chromosom 19p13.12 .....	70
Tab. 18: Detektierte CNVs und Filterschritte in acht konsanguinen iranischen KBE-Patienten .....	71
Tab. 19: Übersicht der vier verbleibenden CNVs in acht konsanguinen iranischen Patienten .....	71

Tab. 20: Heterozygote Varianten mit pathogenem Potential nach PolyPhen-2 und MutationTaster in der Mikroduplikationsregion auf Chromosom 22q11.21 .....	74
Tab. 21: Übersicht der Mikroduplikationsregionen auf Chromosom 22 (22q11.21) detektiert mittels NGS in acht KBE-Patienten .....	74
Tab. 22: Gemeinsame Varianten in der Kopplungsregion auf Chromosom 3 bei zwei konsanguinen marokkanischen KBE-Patienten .....	77
Tab. 23: Genotypisierung von rs3208837 in der konsanguinen marokkanischen Familie.....	78
Tab. 24: Genotypen und Allelfrequenzen von rs3208837 in 378 BEEK-Patienten und 380 gesunden Kontrollen .....	78
Tab. 25: Expression der mausorthologen Gene in der Duplikationsregion auf Chromosom 19p13.12 .....	80
Tab. 26: Analyse der gefundenen drei Varianten in <i>WIZ</i> .....	82
Tab. 27: qPCR Ergebnisse der gefilterten CNV-Befunde in 47 VATER/VACTERL-Patienten .....	93
Tab. 28: Übersicht von Patienten mit Trisomie 18pter→q12 modifiziert nach Schramm et al. 2011 .....	106

## Abkürzungsverzeichnis

AKAP8	A kinase (PRKA) anchor protein 8
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems
v-akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
Ala	Alanin
ALDH1A2	Retinaldehyd-dehydrogenase 2
APC	adenomatous polyposis coli
ARM	anorektale Malformation
BAF	B-Allel-Frequenz
BB	Brachialbogen
βCN	β-catenin
BEEK	Blasenekstrophie-Eispadie-Komplex
BNC1	basonuclin 1
Bp	Basenpaare
BRD4	bromodomain containing 4
C	Cytosin
C9orf11	EQTN; equatorin, sperm acrosome associated
CAPN10	calpain 10
CASP14	caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
Cartagenia	Cartagenia Bench™ Software
CCG	Cologne Center for Genomics
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHRM2	cholinergic receptor, muscarinic 2
CHRM3	cholinergic receptor, muscarinic 3
cM	Centimorgan
Cm	Zentimeter
CNTNAP3	contactin associated protein-like 3
CNV	Kopienzahlveränderung (copy number variation)
CRKL	v-crkl sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like
CT	cycle threshold
CTSE	cathepsin E
CV	consensus value (Konsensus-Wert)
Cyp26a1	cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1
CYP4F11	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 11
CYP4F22	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 22
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61

DACT1	dapper Homolog 1
dbSNP	database of single nucleotide polymorphisms
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DGV	Database of Genomic Variants
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Deoxiribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSH	dishevelled
E	isolierte Epispadie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EnE	Entoderm (Enddarm)
EPPK1	Epiplakin 1
ERK	extra-cellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Exom	Alle proteinkodierenden Sequenzen (das funktionelle Exom)
F	Forward
FGF	fibroblast growth factor
FGF10	fibroblast growth factor 10
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FLU	Flutamid
FNF	frontonasaler Fortsatz
FRAS1	Fraser syndrome 1
FREM2	FRAS1 related extracellular matrix protein 2
FREM3	FRAS1 related extracellular matrix 3
FZD	Frizzeld
G	Guanin
g	Gramm
Gb	Gigabasen
GH	Genitalhöcker
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
Gli2	GLI family zinc finger 2
Gli3	GLI family zinc finger 3
GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1
GPR35	G protein-coupled receptor 35
GS	GenomeStudio
GSK3 $\beta$	glycogen synthase kinase 3 $\beta$
GT	Gestationstag
H610Q	Human610-Quad

---

H610W	Human660W-Quad
HE	Hinterextremitätenknospen
HEATR1	HEAT repeat containing 1
HNR	HEINZ Nixdorf Recall
hg18	Human Genome Browser assembly 18
HH550	HumanHap550v3
HKG	House Keeper Gen
HSPG	heparan sulfate proteoglycan
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
Kb	Kilobasenpaare
KBE	klassische Blasenekstrophie
KE	Kloakenekstrophie
KEn	(kloakales) Entoderm
KLK14	kallikrein-related peptidase 14
KLK9	kallikrein-related peptidase 9
KRR1	small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)
$\lambda$ s	relatives Risiko für Geschwister
$\lambda$ o	relatives Risiko für Nachkommen
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
LOD	logarithm (base 10) of odds
logB	logBayes-Faktor
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
LRR	Log-R Ratio
LZTR1	leucine-zipper-like transcription regulator 1
mA	Milliampere
mAChR	muskarinische Acetylcholinrezeptoren
MAPK	mitogen-activated protein kinases
Mb	Megabasenpaare
Mg	Milligramm
MGI	Mouse Genome Informatics database (MGI)
Min	Minuten
ml	Milliliter
MLPA	multiplex ligations-abhängige Sondenamplifikation (Multiplex ligation-dependent probe amplification)
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MMTV	Maus-Mammatumovirus
MNX1	motor neuron and pancreas homeobox 1
MPI	Max-Planck-Institut
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase
Muscarin ACh	muskarinische Acetylcholinrezeptoren
MXRA5	matrix-remodelling associated 5

---

MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle
NBG	Nabelschnurgefäße
NBS	Nabelschnuranlage
ncRNAs	nicht-kodierende Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
NGS	next generation sequencing
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OB	Ohrbläschen (Innenohrvorläufer)
OK	Oberkiefer
OMNI	HumanOmni1-Quad
OR	Odds Ratio
P	Wahrscheinlichkeit
P2RX6	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel
PARP10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10
PBS	Prune-Belly-Syndrom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion)
PDA	Periduralanästhesie
PDB	Proteindatenbank
PI3K	phosphoinositide-3 kinase
PI4KA	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha
PKB	protein kinase B
PLEC	Plectin
pmol	Picomol
PORCN	porcupine homolog (Drosophila)
PUK	posteriore Urethralklappen
qPCR	Quantitative PCR
R	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROR	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor
RPP38	Ribonuclease P/MRP 38kDa subunit
RT	Raumtemperatur
Sec	Sekunden
SERPIND1	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor member 1)
SET	suppressor of variegation, enhancer of zeste and trithorax (SET nuclear oncogene)
SF-1	steroidogenetic factor 1
SHH	Sonic-Hedgehog-Gen
SLC1A6	solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6
SLC7A4	solute carrier family 7 (orphan transporter), member 4
SNAP29	synaptosomal-associated protein, 29kDa
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus (Single-Nucleotide-Polymorphism)
SO	Somiten

---

SPATA17	spermatogenesis associated 17
SPG	Spinalganglien
STR	short tandem repeats
SV	strukturelle Variation (structural variant)
SYDE1	synapse defective 1, Rho GTPase, homolog 1 ( <i>C. elegans</i> )
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEK	tyrosine kinase, endothelial
T-Gen	T-box containing transcription factor, Synonym: Brachyury
TCF1	transcription factor 1
THAP7	THAP domain containing 7
TP63	tumor protein p63
TTLL3	tubulin tyrosine ligase-like family, member 3
U	Units
UCSC	University of California Santa Cruz
UGS	Urogenitalsinus
UK	Unterkiefer
UPB1	ureidopropionase, beta
UV	ultra violett
V	Volt
VACTERL	angeborene Defekte der Wirbelsäule (vertebral), anorektale Malformation (Analatresie), Fehlbildungen des Herzens (cardial), tracheoösophageale Fistel mit Ösophagusatresie (TE), Fehlbildungen der Nieren (renal) und der Gliedmaßen (limbs)
Val	Valin
VATER	angeborene Defekte der Wirbelsäule (vertebral), anorektale Malformation (Analatresie), tracheoösophageale Fistel mit Ösophagusatresie (TE) und Radiusdysplasie
VE	Vorderextremitätenknospen
WISH	Ganzpräparat <i>in situ</i> Hybridization (whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung)
WIZ	widely interspaced zinc finger motifs
WNT	wingless-type Maus-Mammatumovirus (MMTV) integration site family
WNT11	wingless-type MMTV integration site family, member 11
WNT3A	wingless-type MMTV integration site family, member 3A
WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A
WT	Wildtyp
X	unspezifische Sonden-anlagerung
ZNS	zentralen Nervensystem





# 1 Einleitung

Im Fokus der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit standen die schwersten Formen uro-rektaler Fehlbildungen, der Blasenektrophie-Eispadie-Komplex (BEEK) und anorektale Malformationen (ARM). Es werden in Deutschland jährlich etwa 280 Patienten (Inzidenz 1:2.500) mit diesen Fehlbildungen geboren (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, 1987; Jenetzky, 2007). Es wird vermutet, dass sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren beitragen (Wijers et al., 2010; Reutter et al., 2011). Im folgenden Kapitel werden zunächst die untersuchten Phänotypen (Kapitel 1.1) vorgestellt. Daran anschließend wird die systematische Identifizierung von krankheitsrelevanten Genen und Regionen dargelegt (Kapitel 1.2) und abschließend auf das Netzwerk für kongenitale uro-rektale Fehlbildungen (CURE-Net) eingegangen (Kapitel 1.3).

## 1.1 Untersuchte uro-rektale Fehlbildungen

Einleitend werden Krankheitsbild, Embryologie, Epidemiologie und Genetik der untersuchten uro-rektalen Fehlbildungen vorgestellt (BEEK: Kapitel 1.1.1, ARM: Kapitel 1.1.2).

### 1.1.1 Blasenektrophie-Eispadie-Komplex (BEEK)

Klinisch lässt sich der BEEK hinsichtlich seines Schweregrades in drei verschiedene Subtypen unterteilen: Eispadie (E), klassische Blasenektrophie (KBE) und Kloakenektrophie (KE) (Gearhart, 2002; Ebert et al., 2009).

#### 1.1.1.1 Isolierte Eispadie (E)

Die E stellt die leichteste Form des BEEK dar und resultiert bei beiden Geschlechtern aus einer Entwicklungshemmung. Es kommt zu einem unvollständigen Verschluss der urethralen Platte mit dorsal offen liegender Urethra. Entsprechend der Lokalisation des Meatus reicht das Spektrum der E beim Mann von einer rein glandulären, über eine penile bis hin zur vollständigen E mit freiliegender, dorsaler Urethrarinne (s. Abb. 1A).

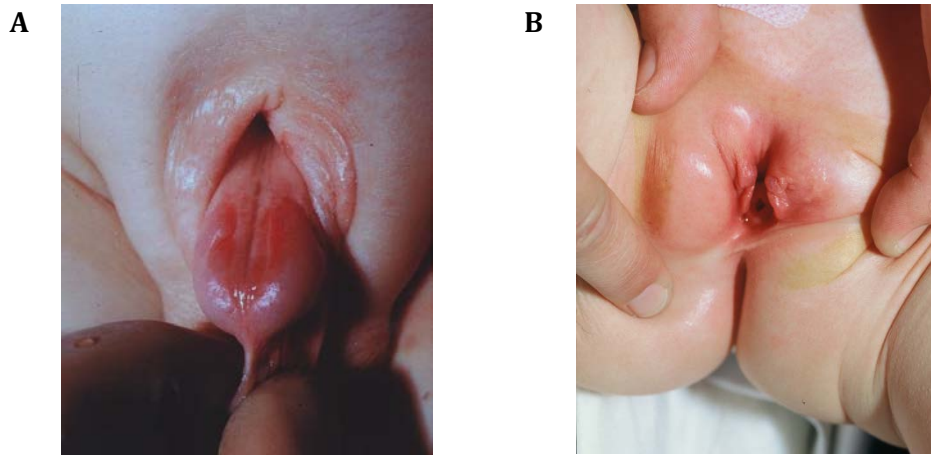


Abb. 1: Männliches (A) und weibliches (B) Neugeborenes mit Epispadie (Ebert et al., 2009)

Bei der Frau manifestiert sich eine variabel gespaltene Harnröhre (Abb. 1B) und die resultierende E kann in drei Grade unterteilt werden (Gearhart, 2002): (1) milde E mit einer klaffenden Urethramündung, (2) mittel-schwere E mit einer Spalte, die die gesamte Harnröhre und den Blasen Hals einbezieht oder (3) eine E mit zusätzlichem Prolaps der Harnblasenmukosa. Die Bauchwand, einschließlich des Nabels, sowie die rektale Anatomie sind hingegen normal entwickelt.

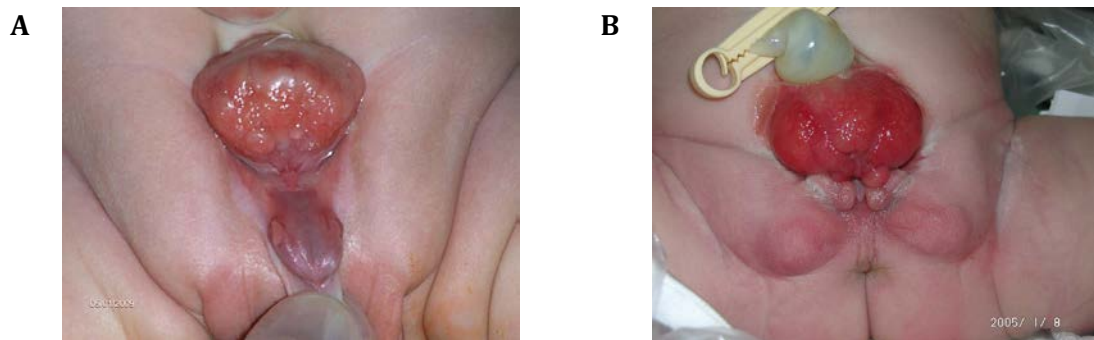
Bei beiden Geschlechtern kann eine Symphysenlücke (Diastase) vorliegen. In den meisten distalen E wird kein unfreiwilliger Harnverlust beobachtet, während bei einer vollständigen E in beiden Geschlechtern ein permanenter Urinverlust vorliegt. Aufgrund der teilweise geringen klinischen Symptome wird vor allem bei Mädchen eine distale E bei der Geburt häufig übersehen. Auch bei den proximalen schweren Formen der E erfolgt die Diagnose oftmals erst im Schulalter aufgrund der persistierenden und anderweitig nicht zu erklärenden Harninkontinenz.

#### 1.1.1.2 Klassische Blasenektrophie (KBE)

Eine Spaltbildung individueller Größe im Bereich des Unterbauchs kennzeichnet, neben einer vollständigen E, die KBE. Die sichtbare Blasenmukosa erscheint bei der Geburt rötlich und Mukosapolypen können auf der Oberfläche zu sehen sein. Ein verzögerter operativer Verschluss kann zu weiteren entzündlichen oder mechanischen Veränderungen der Schleimhaut, wie ein weißlicher Belag, Ulzerationen oder Hyperplasien, führen. Unterhalb des niedrig gelegenen Bauchnabels können oftmals Rektusdiastasen sowie kleine Hernien ertastet werden. Das Schambein kann auf beiden

Seiten der extrophischen Blase ertastet werden und bilaterale Leistenbrüche liegen bei den meisten Patienten beider Geschlechter vor.

Bei männlichen Neugeborenen bedeckt eine frei liegende Blasenplatte den dorsalen Penis. Beide Schwellkörper befinden sich unterhalb der Urethralplatte. Beim männlichen Geschlecht erkennt man bei genauer Untersuchung den Colliculus seminalis und die Ducti ejaculatorii als winzige Öffnungen im Bereich der pars prostatica. Der Penis erscheint kürzer und dorsal gekrümmt (s. Abb. 2A). Die normal ausgeprägten Hoden befinden sich i. d. R. im Hodensack, können aber auch im Leistenkanal liegen.



**Abb. 2: Männliches (A) und weibliches (B) Neugeborenes mit klassischer Blasenektrophie (Ebert et al., 2009)**

Bei weiblichen Neugeborenen liegt eine gespaltene Klitoris mit offener Harnröhren-Platte (s. Abb. 2B) vor. Die vaginale Öffnung erscheint schmaler und der Anus ist oft perineal anteponiert.

### **1.1.1.3 Kloakenektrophie (KE)**

Bei der schwersten Form des BEEK, der Kloakenektrophie (KE), sind mehrere wichtige Organsysteme betroffen. Neben einer KBE liegen zudem eine Omphalozele, eine hohe Form der Analtresie sowie Wirbelsäulendefekte vor. Aufgrund der betroffenen Organsysteme wird die KE ausgehend vom angelsächsischen Sprachraum auch mit dem Akronym "OEIS-Complex" (Omphalocele, Exstrophy, Iimperforate anus, Spinal defects) bezeichnet (Carey et al., 1978). Des Weiteren können u. a. eine Kyphoskoliose (Greene et al., 1991), Klumpfüße (Meglin et al., 1990; Greene et al., 1991; Keppler-Noreuil, 2001) und weitere Fehlbildungen des Herzens, des Magendarmtraktes und des ZNS (Hesser et al., 1984; Meglin et al., 1990; Haldar et al., 1994; Källén et al., 2000; Keppler-Noreuil,

2001; Keppler-Noreuil et al., 2007) auftreten (Ludwig et al., 2005). Üblicherweise endet bei der KE der verkürzte Enddarm zwischen den beiden extrophierten Hemiblasen. Die Öffnung des terminalen Ileums ist am inversen Caecum lokalisiert.



**Abb. 3: Männliches Neugeborene mit Kloakenekstrophie (Ebert et al., 2009)**

Die Symphyse liegt weit auseinander und im Gegensatz zur KBE ist das Becken oft asymmetrisch. Der Penis oder die Klitoris können in zwei Hälften gespalten auf beiden Seiten der Blasenplatte vorliegen (s. Abb. 3).

#### **1.1.1.4 Embryologie des BEEK**

Die Ausprägung des BEEK beginnt in der vierten Schwangerschaftswoche, wenn mesenchymale Zellen nicht angemessen zwischen Ektoderm des Bauches und Kloake wandern. Das mangelhafte Einwandern dieser Zellen führt zu einem Defizit an Bauchdeckenmuskulatur, Faszie und Haut über der vorderen Bauchwand. Derzeit existieren drei verschiedene Erklärungsansätze hinsichtlich der embryologischen Entwicklungsprozesse, die zur Ausbildung des BEEK führen können: (i) eine vorzeitige Ruptur der Kloakenmembran (Muecke, 1964), (ii) eine mechanische Obstruktion der mesodermalen Migration (Männer & Kluth, 2005) oder (iii) reduzierte Zellpopulation im Mesenchym in Folge eines abnormalen Zelltods (Wei & Sulik, 1993; Vermeij-Keers et al., 1996). Eine Störung des mesodermalen Bauchwandgewebes und/oder der Kloakenmembran wird von vielen Autoren als Hauptgrund für die Entstehung des BEEK postuliert (Ludwig et al., 2009a). Neben einer Kombination der oben genannten Hypothesen (Stec, 2011) könnten der Zeitpunkt und die Lokalisation einer Ruptur der

Kloakenmembran über den Schweregrad des resultierenden BEEK von Bedeutung sein (Martínez-Frías et al., 2001).

#### **1.1.1.5 Epidemiologie des BEEK**

Die kombinierte Geburtenprävalenz für das gesamte BEEK-Spektrum wird auf maximal 1 von 10.000 Neugeborenen geschätzt (Ludwig et al., 2009a). Die Geburtsprävalenzen für die unterschiedlichen Subtypen des BEEK wurden mit 2,4 für E (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, 1987), 2,07 bis 2,67 für KBE (Wiesel et al., 2005; Siffel et al., 2011) und 0,25 bis 0,76 für KE (Tank & Lindenauer, 1970; Feldkamp et al., 2011) je 100.000 Geburten (inklusive Schwangerschaftsabbrüchen) geschätzt. Insgesamt sind Männer im Verhältnis 1,5 : 1 bis 6,0 : 1 häufiger betroffen als Frauen (Bennett, 1973; Ives et al., 1980; International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, 1987; Boyadjiev et al., 2004).

Bisher gibt es nur wenige Studien, in denen umweltbedingte Risikofaktoren zum BEEK (Ives et al., 1980; Boyadjiev et al., 2004; Gambhir et al., 2008; Reutter et al., 2011) untersucht wurden, ohne dass ein bestimmter Risikofaktor eindeutig mit dem BEEK assoziiert werden konnte (Ludwig et al., 2009a; Siffel et al., 2011). Als Risikofaktoren wurden das männliche Geschlecht, die ethnische Herkunft, ein erhöhtes parentales Alter (Boyadjiev et al., 2004), eine vermehrte Parität (Byron-Scott et al., 1998) sowie assistierte Reproduktionsverfahren (Shanske et al., 2003; Wood et al., 2003, 2007; Yokoyama et al., 2007; Zwink et al., 2012a) beschrieben.

In frühen Fallberichten wurden vereinzelt Infektionen (Wood, 1869; Jordan et al., 1968) sowie Drogen- oder Alkoholkonsum (Pinette et al., 1996; Robin et al., 1996) mit dem Auftreten des BEEK assoziiert. Einige wenige Beobachtungen führen die Ätiologie des BEEK auf die Einwirkung von Medikamenten während der Schwangerschaft, wie Diazepam, Diphenylhydantoin, Grippeschutzimpfungen, Heparin, Misoprostol, Mysoline, Phenobarbital oder Valproinsäure zurück (Carey et al., 1978; Lizcano-Gil et al., 1995; Orioli & Castilla, 2000; Keppler-Noreuil, 2001; Wakefield et al., 2002; Keppler-Noreuil et al., 2007).

Die Ausprägung des Schweregrades scheint mit maternalem Nikotinkonsum und mit der Exposition gegenüber medizinischer Strahlung in der Frühschwangerschaft assoziiert zu sein (Gambhir et al., 2008; Reutter et al., 2011). Im Sinne eines protektiven Faktors gibt

es Hinweise auf den schützenden Einfluß einer perikonzeptionellen Folsäure-Supplementation für die Entwicklung einer KE (Reutter et al., 2011).

#### **1.1.1.6 Genetik des BEEK**

In diesem Kapitel werden bisherige Befunde zur Genetik der BEEK zusammengefasst. Zunächst werden Studien zu Familienberichten (Kapitel 1.1.1.6.1) und zu Wiederholungsrisiken (Kapitel 1.1.1.6.2) vorgestellt, um dann kurz auf Chromosomenaberrationen (Kapitel 1.1.1.6.3) und abschließend auf Kandidatengenenanalysen (Kapitel 1.1.1.6.4) einzugehen.

##### **1.1.1.6.1 Familienberichte**

In der medizinischen Fachliteratur wurde bisher über 30 Familien mit mehr als einer betroffenen Person (sog. Multiplex-Familien) berichtet (Ludwig et al., 2009a). In 27 dieser Familien wurden jeweils zwei betroffene, in drei Familien jeweils drei betroffene Personen beschrieben. Dabei legt das familiär gehäufte Auftreten die Vermutung nahe, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Entstehung des BEEK spielen, auch wenn die Vererbung offensichtlich keinem einheitlichen Mendelschen Erbgang folgt (Reutter et al., 2003, 2007; Ludwig et al., 2005, 2009b).

##### **1.1.1.6.2 Wiederholungsrisiko**

Erste Studien geben das Wiederholungsrisiko für nicht betroffene Eltern für ein zweites Kind mit BEEK mit etwa 1 % an (Ives et al., 1980). Spätere Berichte gehen von einem geringeren Wiederholungsrisiko aus (Boyadjiev et al., 2004). In der bisher größten Untersuchung zum Wiederholungsrisiko des BEEK bei 2.500 Familien in Nordamerika wurde das Geschwisterwiederholungsrisiko für die KBE mit 0,3 % (1 zu 275), entsprechend einem  $\lambda_s$  von etwa 100 (1 : 275 / 1 : 30.000), angegeben (Shapiro et al., 1984; Risch, 2001). Des Weiteren wurde ein Wiederholungsrisiko für Nachkommen von Betroffenen mit einer E oder KBE von 1,4 % (1 zu 70), entsprechend einem  $\lambda_o$  von 400 - 500 (1 : 70 / 1 : 30.000 - 1 : 60.000), ermittelt (Shapiro et al., 1984). Bei den Betroffenen, die selbst wiederum betroffene Kinder hatten, handelte es sich ausschließlich um Frauen. Dies könnte auf einen möglichen "Carter-Effekt" hinweisen (Carter, 1976), da Frauen seltener vom BEEK betroffen sind.

### 1.1.1.6.3 Chromosomenaberrationen

Bei 23 BEEK-Patienten wurden bisher Chromosomenaberrationen berichtet. Fünfmal waren die Gonosomen betroffen, weitere fünf Patienten sind in der Literatur mit Trisomie 21 und ein Patient mit Trisomie 18 beschrieben (s. Tab. 1).

**Tab. 1: Vorbeschriebene numerische Chromosomenaberrationen bei BEEK-Patienten**

Karyotyp	BEEK	Literatur
47,XXY	E	(Raboch, 1975)
47,XXY	KBE	(Boyadjiev et al., 2004)
47,XXX	KE	(Lin et al., 1993; Husmann & Vandersteen, 1999)
45,X/46,XX (Mosaik)	KE	(Husmann & Vandersteen, 1999)
45,X	KE	(Wladimiroff et al., 1983)
47,XY,+21	KBE	(Reutter et al., 2006b, 2009; Ebert et al., 2008)
47,XX,+21	KBE	(Reutter et al., 2009)
47,XX,+21	KE	(Husmann & Vandersteen, 1999)
Trisomie 18 (keine Geschlechtsangabe)	KE	(Carey et al., 1978)

E: Epispadie; **KBE**: klassische Blasenektrophie; **KE**: Kloakenektrophie

Strukturelle Defekte wurden bei weiteren sieben Patienten (s. Tab. 2), davon sechs Deletionen und eine Duplikation, berichtet. Des Weiteren wurden zwei balancierte und eine unbalancierte Translokation mit resultierender Deletion auf Chromosom 9 (9q34.1-pter) sowie ein Mosaik aus tetra- und diploiden Zellen mit zusätzlicher Translokation der Chromosomen 1;6(p32;q13) im anteilig diploiden Chromosomensatz berichtet.

**Tab. 2: Vorbeschriebene strukturelle Defekte bei BEEK-Patienten**

Karyotyp	BEEK	Literatur
46,XY,del(3)(q12.2q13.2)	KE	(Kosaki et al., 2005)
46,XX,del(1)(p36)	KE	(El-Hattab et al., 2010)
46,XY,del(4)(p?-p?)	BE	(Nicholls & Duffy, 1998)
46,XX,del(4)(p-)	KBE	(Battaglia et al., 1999)
46,XX,del(1)(q41)	KE	(Rotmensch et al., 1991)
46,XY del(1)(q43q44)	KBE	(Zaki et al., 2012)
47,XY,dup(9)(p+)	E	(Chipail et al., 1976)
46,XY,t(8;9)(p11.2;q13)	KBE	(Boyadjiev et al., 2005)
46,XY,t(2;9)(q13;q32)	KBE	(Ludwig et al., 2005)
46,X,der(Y)t(Y;9)(q11.23;q34.1)-del(Y)(q11.2),der(9)t(Y;9)	KE	(Thauvin-Robinet et al., 2004)
tetraploid/diploid/t(1;6)*	KE	(Leonard & Tomkins, 2002)

E: Epispadie; **KBE**: klassische Blasenektrophie; **KE**: Kloakenektrophie; \*: Fibroblasten: 16% (3 Zellen) 92,XXXX; 73% (14 Zellen) 46,XX; 11% (2 Zellen) 46,XX,t(1;6)(p32;q13)

#### 1.1.1.6.4 Kandidatengenanalysen

In der Literatur wurden bisher nur einige wenige Kandidatengene mit dem BEEK in Verbindung gebracht und zum Teil in kleinen Kohorten überprüft. Die entsprechenden Kandidatengene wurden ausgewählt, da zu diesen bereits Assoziationen zu anderen Mittelliniendefekten berichtet wurden, deren Knockout im murinen Tiermodell den BEEK phänotypisch widerspiegelt, oder deren embryologische Funktion eine Rolle in der Entstehung des BEEK vermuten lässt. Weitere Gene wurden durch die Lokalisation in Kopplungsregionen vorgeschlagen. Für keines dieser Kandidatengene konnte bisher eine ursächliche Rolle bei der Entstehung des BEEK nachgewiesen werden. Gänzlich ausgeschlossen kann ein ursächlicher Beitrag aber auch nicht, da jeweils nur wenige Patienten untersucht wurden.

Für drei bekannte syndromale Krankheitsbilder wurden in Einzelfällen bei Patienten mit einer zusätzlich vorhandenen Form des BEEK, in dem jeweils verantwortlichen *MYH9*-, *PORCN*- bzw. *UPB1*-Gen (myosin, heavy chain 9, non-muscle; porcupine homolog [Drosophila]; ureidopropionase, beta) verschiedene pathogene Mutationen gefunden. Bisher gibt es aber keine funktionellen oder genetischen Daten die dafür sprechen, dass diese Gene auch eine Rolle bei der Entstehung des nicht-syndromalen BEEK spielen (Utsch et al., 2006; Yapfite-Lee et al., 2008; Harmsen et al., 2009; Alkindi et al., 2012).

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die bisher erfolgten Kandidatengenuntersuchungen gegeben.

#### **MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase)**

Als Risikofaktoren für angeborene Dysraphien gelten eine zu geringe perikonzeptionelle Folsäureaufnahme sowie eine mangelhafte Verstoffwechselung der aufgenommenen Folsäure (Botto et al., 2002). Die Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR) ist ein Enzym, das im Folsäuremetabolismus des menschlichen Körpers eine wichtige Rolle spielt (van der Put et al., 1995). Bei der MTHFR-Defizienz, die auf einem funktionellen Polymorphismus c.677C>T (Ala222Val) im *MTHFR*-Gen beruht, handelt es sich um den Aktivitätsverlust einer thermolabilen Enzym-Variante (Frosst et al., 1995). Verschiedene Assoziationsstudien deuteten darauf hin, dass dieser Funktionsverlust einen Risikofaktor für die Entstehung von Mittelliniendefekten darstellt (van der Put et al., 1995; Botto & Yang, 2000). Aus diesem Grund wurde eine familienbasierte Assoziationsstudie bei 68 Eltern-Kind-Trios und 23 Mutter-Kind-Paaren aus Deutschland, Österreich und Spanien durchgeführt. Im Ergebnis zeigte sich aber kein



signifikant erhöhtes Risiko für die Entstehung des BEEK bei reduzierter Funktion des Enzyms MTHFR (Reutter et al., 2006a, 2006b). Hingegen zeigte eine aktuelle Studie, dass eine ausreichende perikonzeptionelle Folsäure-Supplementierung das Risiko für die Ausbildung einer schweren Form des BEEK senkt (Reutter et al., 2011).

### **MNX1 (motor neuron and pancreas homeobox 1)**

Mutationen im Gen *MNX1* führen zum Currarino Syndrom (Sakrale Agenesie, präsakrale Masse und ARM), einem dem BEEK verwandten Fehlbildungskomplex (Ross et al., 1998). Die Untersuchung von fünf KBE/KE-Patienten konnte aber keine Mutation nachweisen (Boyadjiev et al., 2004).

### **FGF10 (fibroblast growth factor 10)**

Zu den phänotypischen Knockout-Modellen, die den BEEK widerspiegeln, gehört auch das murine Knockout-Modell *Fgf10*<sup>(-/-)</sup>, das mit ARM und einer nach ventral unverschlossener Urethra einhergeht (Fairbanks et al., 2004; Yucel et al., 2004) (Fairbanks et al., 2004; Yucel et al., 2004). Das gemeinsame Auftreten beider Fehlbildungen erinnert an eine KE. Daher wurde *FGF10* als Kandidatengen für ARM und/oder KE mittels Sanger-Sequenzierung bei je zehn Patienten analysiert, ohne dabei eine ursächliche Mutation zu identifizieren (Krüger et al., 2008a).

### **TP63 (tumor protein p63)**

In der frühen embryonalen Formation des Uro-Rektums spielt p63 eine wichtige Rolle und die Knockout-Maus spiegelt in weiten Teilen eine KE beim Menschen wider (Ince et al., 2002). In einem weiteren murinen Knockout-Modell der Isoform  $\Delta Np63$ <sup>(-/-)</sup> konnte das charakteristische Bild einer KBE komplett nachgestellt werden (Cheng et al., 2006). Angesichts dieser Beobachtung ist *TP63* ein hervorragendes Kandidatengen. Die von Ching et al. (2010) durchgeführte Untersuchung der kodierenden Regionen bei 37 BEEK-Patienten konnte zunächst keine Mutation nachweisen (Ching et al., 2010). Die später von Wilkins et al. (2012) durchgeführte Assoziationsstudie und Untersuchung des Promotorbereichs konnten dann aber eine signifikante Risikoerhöhung durch einen Insertion-/Deletions-Polymorphismus im Promotor von  $\Delta Np63$  nachweisen, der mit einer 18-fach höheren Wahrscheinlichkeit bei den Anlageträgern einhergeht (Wilkins et al., 2012).

**SF-1, SET und CNTNAP3 (9q)**

Thauvin-Robinet et al. berichteten 2004 den Fall eines männlichen Neugeborenen mit KE und terminaler Deletion des chromosomalen Bereichs 9q34.1-qter. Als Kandidatengene wurden die betroffenen Gene *SF-1* (steroidogenic factor 1) und *SET* (SET nuclear oncogene) identifiziert, ohne dass eine pathogene Mutation detektiert werden konnte (Thauvin-Robinet et al., 2004; Reutter et al., 2006c). Außerdem wurde bei einem KBE-Patienten (s. Tab. 2) mit reziproker Translokation (46,XY,t(8;9)(p11.2;q13) der Bruchpunkt innerhalb des *CNTNAP3*-Gens (contactin associated protein-like 3) auf Chromosom 9q13 eingegrenzt (Boyadjiev et al., 2005). Auch hier konnte kein kausaler Zusammenhang zwischen dem Gen und KBE hergestellt werden.

**Chromosomale Regionen auf 4q31.21-22 und 19q13.31-41**

Aufgrund der Seltenheit geeigneter Multiplex-Familien ist die Durchführung klassischer Kopplungsanalysen schwierig. 2009 wurde erstmals eine Kopplungsanalyse in einer deutschen und einer spanischen Familie mit jeweils zwei betroffenen Familienangehörigen mit KBE durchgeführt (Ludwig et al., 2009b). Eine weitere Kopplungsanalyse in einer iranischen Familie wurde ein Jahr später publiziert (Reutter et al., 2010). Dabei zeigten sich familienübergreifend für die spanische und die iranische Familie zwei überlappende Kopplungsregionen auf den Chromosomen 4q31.21-22 und 19q13.31-41 (Reutter et al., 2010). In der Kopplungsregion auf Chromosom 4 kartiert *FREM3* (FRAS1 related extracellular matrix 3) ein Kandidatengen, das mit *FRAS1* (Fraser syndrome 1) und *FREM2* (FRAS1 related extracellular matrix protein 2) verwandt ist. *FRAS1* und *FREM2* sind mit dem Fraser-Syndrom assoziiert, einem komplexen Fehlbildungssyndrom, bei dem auch urogenitale Fehlbildungen beobachtet werden (McGregor et al., 2003; Jadeja et al., 2005). In der überlappenden Kopplungsregion auf Chromosom 19 liegt der Serine Protease Kluster bestehend aus 15 Genen der Kallikrein-Familie. Die dazugehörenden Gene *KLK9* (kallikrein-related peptidase 9) und *KLK14* (kallikrein-related peptidase 14) werden embryonal exprimiert (Shaw & Diamandis, 2007) und wurden wie auch *FREM3* als Kandidatengen bei den Betroffenen der spanischen und der iranischen Familie sequenziert, ohne dass aber krankheitsverursachende Mutationen nachgewiesen werden konnten (Reutter et al., 2010).

### 1.1.2 Anorektale Malformationen (ARM)

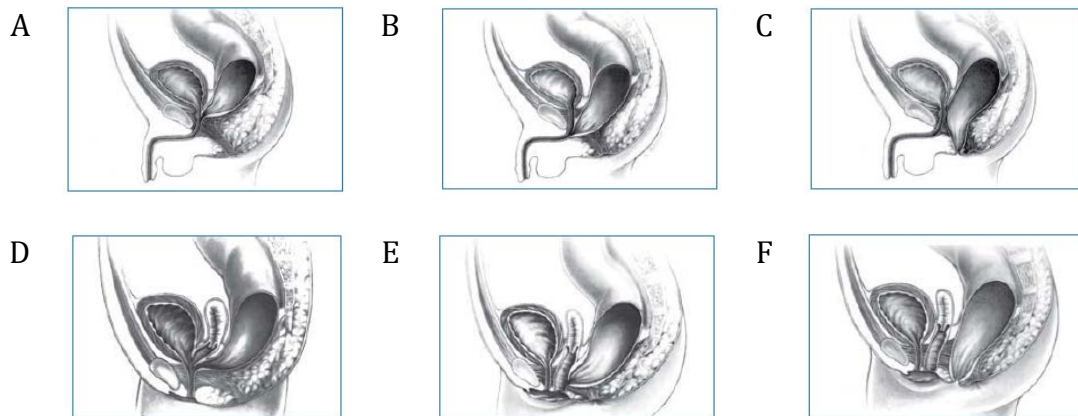
ARM sind Entwicklungsdefekte des Enddarms im Stadium der primitiven Kloake und treten gehäuft mit einer Fistel zum Urogenitaltrakt oder einer Verlagerung der Analöffnung (s. Abb. 4) auf. ARM können wie andere Fehlbildungen isoliert oder in Kombination mit weiteren Fehlbildungen (syndromale Formen) auftreten (Cho et al. 2001) und gehen häufig zeitlebens mit Einschränkungen in der Lebensqualität, vor allem im Bereich der psychosexuellen Entwicklung, einher (Grano et al., 2011). Zusätzliche Malformationen, wie bei der hier untersuchten VATER/VACTERL-Assoziation (Kapitel 1.1.2.1) oder dem Prune-Belly-Syndrom (PBS; Kapitel 1.1.2.2), weisen 20 bis 70 % der ARM-Patienten auf (Hasse, 1976; Boocock & Donnai, 1987; Hassink et al., 1996; Endo et al., 1999; Martínez-Frías et al., 2000; Cho et al., 2001; Cuschieri, 2001, 2002; Mittal et al., 2004; Stoll et al., 2007). Die häufigsten assoziierten Anomalien betreffen den Urogenitaltrakt, das zentrale Nervensystem, das Skelett (Gliedmaßen und Wirbelsäule), das kardiovaskuläre System sowie den Gastrointestinaltrakt (Spouge & Baird, 1986; Cuschieri, 2002). Sowohl genetische als auch Umweltfaktoren könnten zur multifaktoriellen Ätiologie von ARM beitragen (Wijers et al., 2010).

In der Literatur werden eine Vielzahl unterschiedlicher Klassifikationen zur Einteilung von ARM beschrieben (Wangensteen & Rice, 1930; Ladd & Gross, 1934; Santulli et al., 1965; Stephens & Smith, 1971; Peña, 2004; Holschneider et al., 2005). Bis 2005 hatte die Wingspread-Klassifikation (Stepgens 1986) größere Akzeptanz erfahren, die hinsichtlich der Lokalisation des Analkanals in Beziehung zum Musculus levator zwischen hohen, intermediären und tiefen Fehlbildungen unterscheidet (Stephens & Smith, 1971; Rich et al., 1988; Stephens, 1988; Cook, 1990; Chen, 1999; Endo et al., 1999; Mittal et al., 2004). In der Literatur werden von den aufgeführten Autoren Angaben hinsichtlich der relativen Häufigkeit wie folgt gemacht:

- hoch (High): 20 - 52%
- intermediär (Inter): 11 - 54%
- tief (Low): 18 - 57%

Abb. 4 illustriert die Krickenbeck-Klassifikation. Dabei handelt es sich um die heute anerkannteste Klassifikation (Holschneider et al., 2005), die eine Einteilung vornimmt

nach: perineale (kutane) Fistel, rekto-urethrale Fistel, prostatich, bulbär, recto-vesikale Fistel (Blasenhals), vestibuläre Fistel, Kloake (ARM mit rektokloakaler Fistel, Länge des gemeinsamen Kanals a) nicht näher bezeichnet, b) länger als 3 cm, c) kürzer als 3 cm), Analatresie ohne Fistel, Analstenose und sonstige Varianten.



**Abb. 4: Formen der isolierten anorektalen Malformation**

**A:** Analatresie mit recto-prostaticher Fistel; **B:** Analatresie mit recto-bulbärer Fistel; **C:** Analatresie mit recto-perinealer Fistel beim Mann; **D:** kloakale Fehlbildung; **E:** Analatresie mit recto-vaginaler Fistel; **F:** Analatresie mit recto-perinealer Fistel bei der Frau (Verwendung der Bilder mit freundlicher Genehmigung von Alberto Peña).

#### 1.1.2.1 VATER/VACTERL-Assoziation

Das Akronym VATER steht für angeborene Defekte der Wirbelsäule (vertebral), ARM (Analatresie), tracheoösophageale Fistel mit Ösophagusatresie (TE) und Radiusdysplasie und wurde erstmals 1973 beschrieben (Quan & Smith, 1973). Ein Jahr später wurde das Akronym zu VACTERL erweitert, da Fehlbildungen des Herzens (cardial), der Nieren (renal) und Gliedmaßen (limbs) hinzu kamen. Das R stand nun nicht mehr für radiale sondern für renale Fehlbildungen (Temtamy & Miller, 1974). Daher wird heute oft die Kombination VATER/VACTERL-Assoziation verwendet. Schätzungen zur Geburtenprävalenz reichen von 1 - 9 : 100.000 (Czeizel & Ludányi, 1985, 1985; Botto et al., 1997). Es wurde vorgeschlagen, die VATER/VACTERL-Assoziation in eine obere (mit Herz-Fehlbildungen) und eine untere Gruppe (mit Nieren-Fehlbildungen) zu unterteilen (Källén et al., 2001). Für die klinische Diagnose ist der Nachweis von mindestens drei der genannten Kardinalfehlbildungen erforderlich. In der Mehrzahl der Fälle tritt die VATER/VACTERL-Assoziation sporadisch auf. Gelegentlich haben Geschwister oder Eltern von Patienten eine einzelne Fehlbildung.

### 1.1.2.2 Prune-Belly-Syndrom (PBS)

Eine mangelhaft ausgebildete Abdominalmuskulatur, Malformationen des Harntrakts sowie ein bilateraler Kryptorchismus bei männlichen Patienten charakterisieren das Prune-Belly-Syndrom (PBS) (Burbige et al., 1987; Greskovich & Nyberg, 1988; Caldamone & Woodard, 2011). Dieses seltene kongenitale Syndrom wurde erstmalig 1895 von Parker beschrieben. Der Name leitet sich von der schlaffen Bauchhaut ab (s. Abb. 5), die wie eine getrocknete Pflaume („prune belly“) aussieht (Parker, 1895). In der Literatur wird das PBS auch als Eagle-Barret-Syndrom oder Triad-Syndrom beschrieben (Eagle & Barrett, 1950; Nunn & Stephens, 1961).



**Abb. 5: Klassisches Erscheinungsbild des Abdomens bei einem neugeborenen Jungen mit PBS (Hassett et al., 2012)**

In den meisten Fällen handelt es sich um Jungen, nur in 3 - 5 % wird von betroffenen Mädchen berichtet (Rabinowitz & Schillinger, 1977). Bei Mädchen ist das PBS aufgrund der höheren Inzidenz einer kompletten Urethraatresie schwerer (Rabinowitz & Schillinger, 1977; Aaronson & Cremin, 1979; Lubinsky & Rapoport, 1983; Reinberg et al., 1991). Das PBS tritt zudem gehäuft unter dunkelhäutigen Menschen auf (Druschel, 1995; Salihu et al., 2003; Routh et al., 2010).

Die Ursachen des PBS sind unklar. Neben einer angeborenen Obstruktion des unteren Harntraktes, bedingt durch eine Atresie der Harnröhre oder Harnröhrenklappen mit Aufstau in die oberen Harnwege (Loder et al., 1992), wird auch ein Defekt in der Migration des lateralen Mesoderms zwischen der sechsten und siebten Schwangerschaftswoche (Pagon et al., 1979; Terada et al., 1994) in die Bauchwand (Burbige et al., 1987; Shaw et al., 1990; Terada et al., 1994) als ursächlich diskutiert. Zum PBS könnten aber auch beide Mechanismen gleichzeitig beitragen (Sutherland et al., 1995).

Das PBS wurde 1978 nach klinischen Gesichtspunkten von Woodard (1978) in drei Kategorien klassifiziert (s. Tab. 3). 20 % der Kinder mit PBS fallen in die Kategorie 1. Die schwere pränatale Nierenfunktionsstörung und Lungenhypoplasie resultieren in einer nahezu 100 %-igen Mortalität. Kategorie-2-Patienten haben die klassischen Merkmale des PBS. Die Prognose hängt auch hier vom Grad der Nierendysplasie und der konsekutiven pränatalen Lungenhypoplasie ab. (Routh et al., 2010). PBS-Patienten der Kategorie 3 haben milde phänotypische Merkmale sowie eine normale Nierenfunktion (Caldamone & Woodard, 2012).

**Tab. 3: PBS-Klassifizierung nach (Woodard, 1978)**

<b>Kategorie 1 (20 %)</b>	<b>Kategorie 2 (40 %)</b>	<b>Kategorie 3 (40 %)</b>
Lungenhypoplasie und/oder Pneumothorax Oligohydramnie Renale Dysplasie Harnröhrenobstruktion persistierender Urachus Klumpfuß	Typische äußere Merkmale Hydroureteronephrosis Uropathie Renale Dysplasie Risiko für Urosepsis Risiko für Azotämie	Äußere Merkmale mild oder unvollständig Normale Nierenfunktion Milder Grad einer Uropathie

Der anfängliche postnatale Verlauf von PBS-Säuglingen wird durch ihre Komorbiditäten bestimmt: 75 % der geborenen Kinder mit PBS weisen koexistierende Begleiterkrankungen auf (Wright et al., 1986; Green et al., 1993). Die perinatale Mortalität für PBS wird zwischen 10 % und 25 % angegeben und hängt vom Grad der pulmonalen Hypoplasie oder der Frühgeburtlichkeit ab (Hassett et al., 2012). Sowohl genetische als auch umweltbedingte Risikofaktoren, wie z. B. assistierte Reproduktionstechniken, werden derzeit als ursächlich in der Entstehung des PBS diskutiert (Routh et al., 2010; Caldamone & Woodard, 2011; Tonni et al., 2012).

### **1.1.2.3 Embryologie der ARM**

In der normalen Embryologie des Enddarms ist der Bereich der späteren Afteröffnung bereits in einer frühen Embryonalphase gebildet und stellt einen Fixpunkt in der Kloaken- und Enddarmentwicklung dar (Kluth, 2010). ARM bilden sich zwischen der vierten und achten Schwangerschaftswoche aus. Heutzutage nimmt man an, dass ein fehlerhaftes Einsprossen des urorektalen Septums in die Kloake verantwortlich für die Bildung von ARM ist (van der Putte, 1986). Bei mit Ethylenthioharnstoff behandelten Ratten konnte ein Ausfall der Fusion des urorektalen Septums mit der Kloakenmembran als unmittelbarer Grund für rektourethrale Fisteln oder einer persistierende Kloake nachgewiesen werden (Bai et al., 2004). Daraus schlussfolgern die Autoren, dass eine Fehlentwicklung der Kloakenstruktur und des urorektalen Septums wahrscheinlich für die Bildung von ARM verantwortlich sind. Die Untersuchungen an Tiermodellen (van der Putte, 1986; Bai et al., 2004; Zhang et al., 2009c; Kluth, 2010) sowie histomorphologische Untersuchungen menschlicher Embryonen (de Vries & Friedland, 1974; van der Putte, 1986, 2005; Nievelstein et al., 1998; Penington & Hutson, 2003) unterstützen die genannten Hypothesen.

### **1.1.2.4 Epidemiologie der ARM**

Weltweit schwanken die Angaben zur Häufigkeit der ARM von 0,86 bis 7,7 pro 10.000 Geburten deutlich. Am ehesten ist aber von einer Häufigkeit von 2,0 bis 2,5 pro 10.000 Lebendgeburten auszugehen (Murphy et al., 2006). Je nach Form und Schweregrad werden ARM in verschiedene Subgruppen unterteilt. In einer systematischen Literaturübersicht konnten Zwink et al. (2011) zeigen, dass die Ursachen der ARM noch weitgehend unbekannt sind. Die bisher berichteten epidemiologischen Studien sind allerdings sehr heterogen im Hinblick auf Fallzahl, Erfassungszeitraum, Kontrollen und Adjustierung nach möglichen Störgrößen und schränken so die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ein. Des Weiteren sind viele Fälle wenig präzise beschrieben und differenzieren z. B. nicht zwischen isolierten und syndromalen Formen. Aufgrund der Seltenheit der ARM wurden oft unterschiedliche Altersgruppen gemeinsam ausgewertet. Je länger jedoch die Schwangerschaft zurückliegt, desto größer ist die Gefahr einer Erinnerungsverzerrung der berichtenden Eltern (sogenannter Recall-Bias).

Als Risikofaktoren wurden in einigen Studien Nikotinkonsum (Angerpointner et al., 1981; van Rooij et al., 2010), Alkoholkonsum (Yuan et al., 1995), Koffeinkonsum (Miller et al., 2009), Übergewicht während der Schwangerschaft (Waller et al., 2007; Blomberg & Källén, 2010; van Rooij et al., 2010) und maternaler Diabetes (Aberg et al., 2001; Frías et al., 2007; Correa et al., 2008) diskutiert. Konsistent erhöhte Risiken zeigten sich nach einer Metaanalyse für den väterlichen Nikotinkonsum sowie den maternalen Diabetes mellitus und das maternale Übergewicht (Zwink et al., 2011). Die weltweit steigende Prävalenz von Diabetes und Übergewicht könnte somit für die Fehlbildung von entscheidender Bedeutung sein. Jedoch wurde in den bisherigen Studien z. B. nicht zwischen Diabetes Typ 1 und 2 unterschieden, dadurch wird eine genaue Interpretation der Ergebnisse erschwert.

Eine künstliche Befruchtung stellt ein Risiko für ARM bei Einlingen (Odds Ratio (OR): 17,3) dar, allerdings ist das Risiko nach IVF (*in vitro* Fertilisation; OR: 18,8) doppelt so groß wie nach ICSI (intrazytoplasmatische Spermieninjektion; OR: 7,7) (Zwink et al., 2012b). Da ICSI eher bei männlicher Subfertilität durchgeführt wird, spricht dieses Ergebnis für eine mögliche Ursache in der weiblichen Subfertilität.

Neben diesen beim Menschen untersuchten Risikofaktoren finden sich in der Literatur auch teratogen induzierte Tiermodelle. Hier wurde ARM bei Mäusen und/oder Ratten nach Induktion von Ethylenethiourea (Hirai & Kuwabara, 1990; Qi et al., 2002), Retinsäure (Diez-Pardo et al., 1995) oder Adriamycin (Millar et al., 2001) beobachtet.

#### **1.1.2.5 Genetik der ARM allgemein**

Abgesehen von wenigen syndromalen Formen, wie z. B. dem Currarino Syndrom (Crétolle et al., 2008), ist nur wenig über die genetischen Ursachen bekannt (Falcone et al., 2007). Verschiedene Befunde weisen darauf hin, dass genetische Faktoren entscheidend in die Ätiologie der ARM involviert sind (Martínez-Frías et al., 2000). So wurden mehrere Multiplex-Familien mit ARM beschrieben und in einer Kohorte von 1.606 Patienten fand sich in 1,4 % der Fälle eine positive Familienanamnese (Falcone et al., 2007; Hilger et al., 2012). Ein weiterer Hinweis für den Einfluss genetischer Faktoren in der Entstehung von ARM zeigt sich durch die Literaturrecherche von Marcelis et al. (2011), in der die Autoren 114 Patienten mit ARM und assoziierten chromosomalen Veränderungen beschreiben (Marcelis et al., 2011). Zu den häufigen assoziierten



numerischen Chromosomenstörungen zählen die Trisomien 13, 18, und 21 (Nagai et al., 1994; Endo et al., 1999; Cho et al., 2001) und zu den häufigen strukturellen Chromosomenstörungen zählen das Cat-Eye-Syndrom sowie die Mikrodeletion 22q11.2 (Prieto et al., 2007; Rosa et al., 2010). Zu den monogenen syndromalen Formen mit bekannter genetischer Ursache zählen das Townes-Brocks- (Sudo et al., 2010), das Klippel-Feil- (Costa et al., 2011; Jovankovičová et al., 2012) oder das Pallister-Hall-Syndrom (Biesecker et al., 1996).

Neben diesen beim Menschen bekannten syndromalen Formen gibt es auch genetische Knockout-Modelle bei Tieren. Zu den bekannten genetischen Modellen für ARM zählen das murine Knockout-Modell für das Sonic-Hedgehog (*SHH*)-Gen und die Transkriptionsfaktoren Gli(GLI family zinc finger)2 und Gli3 (Kimmel et al., 2000; Mo et al., 2001). Im Tiermodell zeigten sich hier bei Knockout-Mäusen neben ARM multisystemische Defekte im Sinne der VATER/VACTERL-Assoziation. Untersuchungen beim Menschen konnten aber Mutationen im *SHH*-Gen als häufige Ursache der ARM ausschließen (Garcia-Barceló et al., 2008). Unabhängig von diesen genetisch induzierten Tiermodellen wird regelmäßig das sporadische Auftreten von ARM bei Hausschweinen beobachtet (Lambrecht & Lierse, 1987).

## **1.2 Systematische Identifizierung von kausalen Genen und Regionen bei seltenen angeborenen uro-rektalen Fehlbildungen**

Insgesamt wurden in der Vergangenheit nur wenige und mit einer geringen Zahl von Betroffenen einhergehende Multiplex-Familien mit ARM- oder BEEK beschrieben, so dass konventionelle Kopplungsanalysen bisher nicht zur Identifikation krankheitsrelevanter Gene geführt haben.

Diese Arbeit greift zur systematischen Identifizierung von kausalen Genen und Regionen auf modernste (state of the art) Techniken zurück, die sich in der Genetik zunehmend etabliert haben. Die Erhebung genomweiter Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)-Daten wurde schwerpunktmäßig zur Identifikation von Kopienzahlveränderungen (CNVs; copy number variants; s. Kapitel 1.2.1) durchgeführt und kann bei ausreichender Patientenzahl auch zukünftig für eine GWAS genutzt werden. Zudem bieten neue

Sequenzierungstechnologien (NGS; Next Generation Sequencing; s. Kapitel 1.2.2) ebenfalls einen vielversprechenden Ansatz zur Identifikation kausaler Varianten.

Mögliche Kandidatengene wurden über positionelle Untersuchungen mittels CNV- oder NGS-Analysen, oder aufgrund ihrer zugeschriebenen embryonalen Funktion mittels Literaturrecherchen und/oder Expressionsanalysen in Mäuseembryonen, identifiziert.

### **1.2.1 Untersuchungen zu ursächlichen Kopienzahlveränderungen (CNV-Analysen)**

Bereits die ersten bahnbrechenden Analysen des menschlichen Genoms haben eine unerwartet hohe Variabilität von Duplikationen und Deletionen genomischer Regionen offenbart (Iafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004). Seitdem haben eine Reihe von Studien gezeigt, dass CNVs eine große Rolle in der genetischen Vielfalt spielen (McCarroll et al., 2006; Redon et al., 2006; Henrichsen et al., 2009).

Abhängig vom Umfang der Studien und den verwendeten Methoden gibt es unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit von CNVs im Genom (Conrad et al., 2010; Mills et al., 2011). Es wird geschätzt, dass CNVs bis zu 12 % des humanen Genoms abdecken (Redon et al., 2006; Zogopoulos et al., 2007; McCarroll et al., 2008b; Perry et al., 2008; Henrichsen et al., 2009) und mehr als 40 % aller identifizierten CNVs bekannte kodierende Regionen umspannen (Henrichsen et al., 2009; Van den Veyver et al., 2009). Dadurch kommt den CNVs eine bedeutende Rolle in der Regulation der Genexpression (Henrichsen et al., 2009; Choy et al., 2010) und somit letztendlich auch in der Evolution des menschlichen Genoms (Feuk et al., 2006a, 2006b) und der Entstehung von Erkrankungsprozessen (Shelling & Ferguson, 2007) zu. Im Vergleich zu SNPs haben CNVs wahrscheinlich eine größere phänotypische Auswirkung (Cooper et al., 2007).

Die vorliegende Arbeit definiert CNVs als DNA-Segmente unabhängig von Größe und Frequenz mit abweichender Kopienzahl im Vergleich zu einem Referenzgenom. In der englischsprachigen Fachliteratur werden im Zusammenhang mit dieser Definition von CNVs häufig weitere Begrifflichkeiten genannt:

- low copy repeat (LCR) (Lupski, 1998),
- segmental duplication (Eichler, 2001),
- large-scale copy-number variation (LCV) (Iafrate et al., 2004),

- large-scale copy number polymorphism (CNP) (Sebat et al., 2004),
- duplication und indel variation (Tuzun et al., 2005),
- structural variant (SV) (Feuk et al., 2006a),
- copy number polymorphism (CNP) (Redon et al., 2006).

CNVs können ursächlich für das sporadische Auftreten von Geburtsfehlern (Lu et al., 2008), Erkrankungen, die einem Mendelschen Erbgang folgen, sowie Erkrankungen mit genetisch komplexem Hintergrund sein (Zhang et al., 2009a). Die mögliche Rolle von (häufig auch *de novo*) CNVs in komplexen Erkrankungen wird durch eine wachsende Anzahl von Studien unterstützt (Buchanan & Scherer, 2008; Wain et al., 2009; Soemedi et al., 2012; Southard et al., 2012). In diesem Zusammenhang haben Wain et al. (2009) exemplarisch die Assoziationen zwischen CNV Befunden und Suszeptibilität für Autismus (Sebat et al., 2007; Szatmari et al., 2007; Kumar et al., 2008; Marshall et al., 2008; Weiss et al., 2008), Schizophrenie (International Schizophrenia Consortium, 2008; Stefansson et al., 2008; Walsh et al., 2008; Xu et al., 2008), Morbus Crohn (McCarroll et al., 2008a), Psoriasis (Hollox et al., 2008), systemischen Lupus erythematodes (Aitman et al., 2006; Fanciulli et al., 2007; Yang et al., 2007), amyotrophe Lateralsklerose (Blauw et al., 2008) und AIDS (Gonzalez et al., 2005) aufgeführt.

Die Bedeutung von CNVs zeigen auch die hochgerechneten Mutationsraten, die im Laufe der letzten Jahre stetig nach oben korrigiert wurden. Zunächst wurden *de novo* lokusspezifische Mutationsraten für CNVs zwischen  $1,7 \times 10^{-6}$  und  $1,0 \times 10^{-4}$  pro Locus und Generation geschätzt (van Ommen, 2005; Lupski, 2007). In den Folgejahren wurden weitere Schätzungen erhoben, die eine genomweite Mutationsrate von 0,01 bis 0,02 pro Transmission und Generation für CNVs mit einer Mindestgröße von 10 Kb angeben (Sebat et al., 2007; Marshall et al., 2008; Itsara et al., 2010; Levy et al., 2011; Sanders et al., 2011). Aktuell liegt die geschätzte Mutationsrate von strukturellen Mutationen bei 0,07 bis 0,12 pro Generation (Malhotra & Sebat, 2012).

CNVs können aber auch analog zu SNPs neutrale polymorphe Varianten darstellen (Zhang et al., 2009a). Die wachsende Bedeutung dieser neutralen CNVs spiegelt die steigende Zahl von gelisteten Einträgen in der Datenbank für genomische Varianten (Database of Genomic Variants, DGV) wider (Iafrate et al., 2004). Ziel der DGV ist es, einen umfassenden Überblick über strukturelle Variationen im menschlichen Genom

bereitzustellen. Diese werden hier als genomische Veränderungen definiert, die DNA-Segmente mit einer Mindestgröße von 1 Kb (Stand 2004 bis 2010) bzw. 50 Bp betreffen (Stand 2012). Der Inhalt der Datenbank repräsentiert nur strukturelle Variationen, die bei gesunden Kontrollpersonen identifiziert wurden (<http://dgvbeta.tcag.ca/dgv/app/about?ref=NCBI36/hg18>). So waren 2004 zunächst 255 CNVs (Iafrate et al., 2004) gelistet, 2009 waren es bereits 38.406 (Zhang et al., 2009a) und Ende 2012 sind 292.693 CNVs in der DGV dokumentiert (<http://dgvbeta.tcag.ca/dgv/app/home?ref=NCBI36/hg18>).

### **1.2.2 Next Generation Sequencing (NGS)**

Die Methodik der automatischen Sanger-Sequenzierung dominiert seit ihrer Erstbeschreibung 1977 (Maxam & Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977) und anschließender Etablierung die molekulargenetischen Analysen und ist auch heute noch der Goldstandard. Die großen Einschränkungen der Sanger-Sequenzierungsprotokolle für noch umfangreichere Sequenz-Analysen sind die Notwendigkeit von Gelen und Polymeren als Trennmedien für die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente, die relativ geringe Anzahl von parallel analysierbaren Amplikons und die Schwierigkeit der vollständigen Automatisierung der Probenvorbereitungsmethoden (Ansorge, 2009). Daher wird zunehmend für verschiedene Fragestellungen eine neue Generation der Sequenzierung in der Forschung und Diagnostik etabliert, die diese Limitierungen der Sanger-Sequenzierung ausgleichen und das parallele Prozessieren von Millionen von Amplikons erlaubt. Die automatisierte Sanger-Methode wird als "erste Generation"-Technologie angesehen und die neueren Methoden werden als NGS bezeichnet. Weitere Vorteile der NGS-Technologien sind eine deutliche Reduktion sowohl der Kosten als auch der Zeit. So hat die erste vollständige Sanger-Sequenzierung des kompletten menschlichen Genoms 13 Jahre gedauert und ca. drei Milliarden US Dollar gekostet (International Human Genome Sequencing Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Die Analyse unterschiedlicher Genome mit verschiedenen NGS-Technologien hat in den letzten Jahren nur noch ca. 100.000 US Dollar gekostet und wenige Wochen gedauert (Metzker, 2010); seit kurzem wird sogar das 1.000 US Dollar Genom vorhergesagt (Mardis, 2006).

Diese neueren NGS-Technologien repräsentieren unterschiedliche Strategien, die auf einer Kombination von Amplikonherstellung, Sequenzierung und Bildgebung sowie Alignment- und Sequenzanordnungsmethoden beruhen (Metzker, 2010). Drei kommerzielle Technologien von Roche (454), Illumina (Solexa) und Life Technologies/Applied Biosystems (SOLiD) konnten sich zunächst am Markt durchsetzen und werden im Methodenteil weiter vorgestellt (Kapitel 3.2.10). Die große Herausforderung der NGS-Technologien an die Bioinformatik sind dabei die Verarbeitung der großen Datenmengen, die Interpretation der Sequenzdaten und das damit verbundene Filtern der vielen polymorphen Varianten. Erste geeignete bioinformatische Programmlösungen für den Endanwender wurden bereits entwickelt und stehen zur Verfügung (Zhang et al., 2011).

So konnte das NGS in den vergangenen Jahren erfolgreich bei der Erforschung seltener Erkrankungen, z. B. beim Miller-Syndrom, Schinzel-Giedion-Syndrom und Morbus Charcot-Marie-Tooth, eingesetzt werden. Zum einen wurden für bekannte Kopplungsregionen die Sanger-Resequenzierungen ersetzt und zum anderen konnten unmittelbar kausale Mutationen identifiziert werden (Ng et al., 2010b). Ng et al. (2010b) fassen einige publizierte NGS-Studien zusammen, die autosomal dominante (Brkanac et al., 2009; Ng et al., 2009, 2010a; Hoischen et al., 2010; Nikopoulos et al., 2010; Sobreira et al., 2010), rezessive (Edvardson et al., 2010; Lalonde et al., 2010; Rehman et al., 2010; Roach et al., 2010; Volpi et al., 2010; Walsh et al., 2010) und X-chromosomal rezessive (Johnston et al., 2010) Erkrankungen aufklären konnten.

NGS kann ein probates Instrument für die Erforschung von ARM und BEEK darstellen, um einerseits mit anderen Methoden identifizierte Kandidatengenregionen zu analysieren und andererseits direkt *de novo* Mutationen zu identifizieren.

### **1.3 Netzwerk für kongenitale uro-rektale Fehlbildungen (CURE-Net)**

Das Ziel des Forschungsnetzwerkes für kongenitale uro-rektale Malformationen (CURE-Net) ist die systematische Untersuchung der molekularen Ursachen, der klinischen Implikationen sowie der psychosozialen Auswirkungen bei angeborenen uro-rektalen Malformationen.

In diesem Verbund arbeiten seit 2009 klinisch tätige Ärzte und Grundlagenwissenschaftler aus verschiedenen Fachbereichen deutschlandweit mit den beiden Patientenorganisationen "Selbsthilfegruppe Blasenektrophie/Epispadie e. V." (SHG BE e. V.) und "Selbsthilfeorganisation für Menschen mit angeborenen anorektalen Fehlbildungen" (SoMA e. V.) zusammen.

Ziel der molekulargenetischen Grundlagenforschung, in deren Rahmen diese Arbeit verfasst werden sollte, ist die Identifizierung krankheitsverursachender Gene in großen und klinisch gut charakterisierten Patientengruppen. Dafür kommen die in Kapitel 1.2 vorgestellten Methoden zur Anwendung. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bilden u. a. die Grundlage für die Analysen der am Max-Planck-Institut (MPI) in Berlin ansässigen Teilprojektgruppe von CURE-Net. Hier sollen Kandidatengene ausgehend von gewebe- und gestation-spezifischen Expressionsdaten im Mausmodell identifiziert und dann im Patientenkollektiv überprüft werden. Das langfristige Ziel ist es, die ursächlichen Mechanismen der zugrunde liegenden embryonalen Fehlentwicklung bei ARM und dem BEEK aufzuklären.

Darüber hinaus werden in weiteren Teilprojektgruppen der postoperative Behandlungserfolg und die unterschiedlichen Formen der Nachsorge durch multizentrische, klinische und psychosoziale Forschung mithilfe standardisierter Untersuchungsverfahren sowohl prospektiv als auch in einer Querschnittsstudie evaluiert. Dafür baut CURE-Net nachhaltig eine Infrastruktur mit einer eigenen DNA-Biobank und einem dazugehörigen nationalen klinischen Register auf. So wird eine einheitliche und standardisierte Datenerhebung der untersuchten Malformationen auch hinsichtlich einer langfristigen Erfassung ermöglicht, die es bisher in Deutschland nicht gab. Damit kann ein statistisch leistungstarkes DNA-Kollektiv mit entsprechenden Patientendaten für die unterschiedlichen Phänotypen bereit gestellt werden.

## 2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, seltene hochpenetrante Kandidatenregionen und -gene für BEEK und ARM zu identifizieren. Für diese Arbeit standen zu Beginn DNA-Proben von 300 BEEK-Patienten sowie Blutproben von 100 ARM-Patienten zur Verfügung. Mit der Hilfe der an dieser Studie beteiligten Chirurgen und Humangenetiker sollte das DNA-Kollektiv für die genetischen Analysen auf eine Probenzahl von über 1.000 Patienten erweitert werden. Ein Ziel war somit der Aufbau einer umfangreichen Biobank für genetische Untersuchungen.

Für die systematische molekulargenetische Analyse sollten genomweite Genotypisierungsdaten mithilfe von SNP-Arrays von Illumina erhoben werden. Das Ziel der vorliegenden Studie war die Identifizierung von *de novo* Kopienzahlveränderungen (CNVs), welche durch Verlust oder Zugewinn an genetischem Material charakterisiert sind und zur Entstehung von BEEK oder ARM beitragen. Der Fokus sollte hierbei auf CNVs gelegt werden, die kodierende Gensequenzen involvieren.

Weiterhin sollten speziell ausgewählte Patienten mithilfe von NGS-Technologien analysiert werden, um seltene dominante *de novo* Mutationen bzw. kleine genomische Aberrationen, sowie seltene autosomal-rezessiv vererbte Mutationen zu identifizieren. Ziel dieser Arbeit war es auch, basierend auf einer systematischen Literaturrecherche, Kandidatengene zu identifizieren.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bernhard G. Herrmann (Abteilung für Entwicklungsgenetik, MPI für Molekulare Genetik, Berlin) sollten ausgewählte Kandidatengene bezüglich ihrer Expression im Mäuseembryo entsprechend dem Zeitpunkt und Ort der Entstehung der Fehlbildung beim Menschen untersucht werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien war die systematische Analyse dieser Gene mittels Sanger-Sequenzierung in einer großen Anzahl von Patienten zur Identifizierung hoch-penetranter Mutationen ein weiteres Ziel.

## 3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden zunächst die verwendeten Materialien (Kapitel 3.1) vorgestellt. Daran schließen sich die Kapitel molekularbiologische Untersuchungen (Kapitel 3.2) sowie bioinformatische und statistische Methoden (Kapitel 3.3) an. Abschließend werden die durchgeführten Analysen (Kapitel 3.4) sowie die Filterkriterien (Kapitel 3.5) dargestellt.

### 3.1 Verwendete Materialien

Es werden in den folgenden Unterkapiteln die verwendeten Geräte (Kapitel 3.1.1), Chemikalien und Enzyme (Kapitel 3.1.2), Lösungen (Kapitel 3.1.3), kommerzielle Kits (Kapitel 3.1.4) sowie Software und Datenbanken (Kapitel 3.1.5) alphabetisch gelistet.

#### 3.1.1 Geräte

Autoklav

- Varioklav 135 S Dampfsterilisator, H+P Labortechnik, Oberschleißheim

Automatischer Sequenzierer

- 3130xl Genetic Analyzer, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA

DNA-Bank/Verwaltung

- 2D CYPHER Tubes, 2D CYPHER 1,2 ml Cluster Tube Racks, 2D CYPHER SmartScan Solo und SmartScan 96, ABgene, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

DNA-Extraktion

- Chemagic Magnetic Separation Module I v20, PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH, Baesweiler

Eismaschine

- AF 100, Scotsman, Mailand, Italien

Elektrophoresekammern



- WIDE MINI-SUB® CELL GT und Sub-Cell Model 96, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

#### Gel-Dokumentations-System

- DVP-1200, SEIKO Precision Inc., Narashino, Chiba, Japan
- Gel Doc™ XR System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

#### Genotypisierungssysteme

- iScan System, Illumina, San Diego, Kalifornien, USA

#### Inkubationsschrank

- Heraeus, Kendo, Langenselbold

#### Nukleinsäure-Messgeräte

- NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer und NanoDrop® ND-8000 8-Kanal UV/Vis-Spektralphotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

#### Mikrowelle

- MW 9625, SEVERIN Elektro, Sundern

#### Pipettierhilfen

- e120, Biohit Oyj, Helsinki, Finnland
- Eppendorf Research 0,1 - 2,5 µl; 0,5 - 10 µl; 2 - 20 µl; 10 - 100 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl, 500- 5000 µl, Eppendorf AG, Hamburg
- Eppendorf Research pro 20 - 300 µl, Eppendorf AG, Hamburg
- Finnpipette® 16-Kanal, VWR International GmbH, Darmstadt
- Transferpette, 0,5 - 10 µl; 2 - 20 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl, Brand, Wertheim
- Transferpette®-8 0,1 µl-1 µl; 10 -100 µl, 20 - 200 µl, Eppendorf AG, Hamburg

#### Pipettierroboter

- Biomek NX-MC und Biomek NX-S8, Beckman-Coulter, Fullerton, Kalifornien, USA

#### pH-Wert Messgerät

- inoLab® pH 720, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW) GmbH, Weilheim

### Pumpensysteme

- PC 2004 Vario, Vacuubrand & Co. KG MZ 2C Membran Vacuum Pumpe, Vacuubrand & Co. KG, Wertheim

### Reinstwassersystem

- Milli-Q A10 Synthesis, Millipore, Molsheim ,Frankreich

### Schüttel-, Misch- und Heizgeräte

- Micro Plate Shaker DMS-2500, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
- Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg
- Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg
- Titramax 101, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
- Unimax 1010/Polymax 1040, Heidpolph, Schwabach
- Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

### Spannungsgeräte

- PowerPac Power Supplies, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

### Thermocycler

- ABI Prism®7900HT Fast real-Time PCR System (TaqMan), Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- C1000™ und S1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- PTC 100 und PTC 200, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA

### Trockenschrank

- Heraeus FunctionLine, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

### Waagen

- Sartorius Talent, Satorius AG, Göttingen

### Zentrifugen

- Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg
- Heraeus Megafuge 1.0, Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Biofuge fresco und Thermo Scientific, Heraeus Biofuge picco, Waltham, Massachusetts, USA
- neoLab-Mini-Zentrifuge Spectrafuge, Heidelberg

- Vakuumzentrifuge Speed Vac Plus SC110A, Thermo Electro Corporation, Erlangen

### 3.1.2 Chemikalien und Enzyme

Soweit möglich, wurden Chemikalien mit der Qualitätsbezeichnung „pro analysis“ verwendet.

- Agarose low EEO (Agarose Standard), AppliChem GmbH, Darmstadt
- Alconox, Alconox Inc., New York, USA
- Bromphenolblau, Merck KGaA, Darmstadt
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Essigsäure (Eisessig; 100 %), Merck KGaA, Darmstadt
- Ethanol absolut (EtOH; 99,9 %), Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
- Ethanol (EtOH; 96,0 %, vergällt mit 1 % Methylethylketon), WALTER CMP GmbH & Co. KG, Kiel
- Ethidiumbromid ( $C_{21}H_{20}N_3Br$ ; EtBr) (1%), Merck KGaA, Darmstadt
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; reinst), Merck KGaA, Darmstadt
- Expand™ Long Template PCR System [5 U/ $\mu$ l], Roche, Mannheim
- Ficoll™ PM400, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
- Glycogen lypophilisiert, aus Austern, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- HotStar *Taq* DNA-Polymerase [5 U/ $\mu$ l], Qiagen GmbH, Hilden
- HPLC Wasser, Merck KGaA, Darmstadt
- Isopropanol, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Natriumacetat (NaAc), Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumhypochlorit (12 %), Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Natronlauge (NaOH; Maßlösung 0,1M), AppliChem GmbH, Darmstadt
- Tris  $\geq$  99,9 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- VWR-*Taq* DNA-Polymerase [5 U/ $\mu$ l], VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

### 3.1.3 Lösungen

Alle Lösungen wurden nach Möglichkeit mit demineralisiertem, sterilfiltriertem und autoklaviertem Wasser angesetzt.

#### Bromphenol-Auftragspuffer

- 10 ml 10 x TBE, 10 ml 0,1% Bromphenolblau, 40 ml 20% Ficoll (8 g) ad 100 ml dest. Wasser

#### EDTA Tris-EDTA (TE<sup>-4</sup>)

- 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris.Cl pH 8,0

#### Ethanol 70 %

- 729 ml Ethanol (96 %), 271 ml dest. Wasser

#### Ethanol 85 %

- 885 ml Ethanol (96 %), 115 ml dest. Wasser

#### Natriumacetat (NaAc) 3M, pH 5,2

- NaAC mit Essigsäure (100 %) auf pH-Wert von 5,2 eingestellt

#### 0,4 % Natriumhypochloritansatz

- 16,7 ml Natriumhypochlorit, 483,3 ml dest. Wasser

### 3.1.4 Kommerzielle Systeme (Kits)

- Agencourt AMPure XP - PCR Purification, Beckman-Coulter, Fullerton, Kalifornien, USA
- Agencourt CleanSEQ - Dye Terminator Removal, Beckman-Coulter, Fullerton, Kalifornien, USA
- Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- chemagic DNA Blood Kit special (2 ml, 5 ml und 10 ml), PerkinElmer chemagen Technologie GmbH, Baesweiler

- Deoxiribonukleosidtriphosphate [dNTPs; dNTP-Mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP) 10 mM als Gebrauchslösung in H<sub>2</sub>O verdünnt auf je 1,25 mM], Labomedic GmbH, Bonn
- DNA ladder 100 Bp, AppliChem GmbH, Darmstadt
- DNA ladder 1 Kb, AppliChem GmbH, Darmstadt
- EDTA-haltige Monovetten von 1,2 bis 10 ml, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
- HumanHap550v3 (HH550), Human610-Quad (H610Q), Human660W-Quad (H660W) und HumanOmni1-Quad (OMNI) DNA Analysis Kit, Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
- Oragene® DNA (OG-250) und (OG-500) DNA Genotek, OraSure Technologies Inc., Bethlehem, Pennsylvania, USA
- PAXgene® Blood RNA-Systems, Qiagen, Hilden
- Power SYBR Green PCR Master Mix, Life Technologies Corporation, Foster City, Kalifornien, USA
- PowerPlex® 16-System, Promega, Madison, Wisconsin, USA
- QIAamp DNA Blood Maxi Kit, QIAquick Gel Extraktion Kit, QIAquick Purification Kit, Qiagen, Hilden
- REPLI®-Midi Kit, Qiagen, Hilden
- SALSA® MLPA® KIT P250-A1 DiGeorge,MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande
- SuperScript® III First-Strand, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
- TRIS-Borat-EDTA-Puffer(TBE) 10x, AppliChem GmbH, Darmstadt

### 3.1.5 Software und Datenbanken

Alle angegebenen Internetadressen sind mit Stand vom 06.01.2013 abgerufen und erfasst worden.

- (PS)<sup>2</sup>-v2: Protein Structure Prediction Server  
<http://ps2v2.life.nctu.edu.tw/index.php>
- 3130xl Data Collection Software v3.0, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- ABgene 2D CYPHER Pilot Databases, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

- Adobe Illustrator CS3 v13.0.2, Photoshop CS3 v10.0.1, Reader Professional v8.1.4 und Reader X v10.1.4, Adobe Systems GmbH, San Jose, Kalifornien, USA
- BeadScan, Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
- Biomek Software 3.2, Beckman/Coulter, Fullerton, Kalifornien, USA
- Cartagenia Bench™ software (Cartagenia n.v., Leuven, Belgien)
- chemagic Quality Assurance Software, PerkinElmer chemagen Technologie GmbH, Baesweiler
- Chip Bioinformatic Tools <http://snpper.chip.org/>
- Coffalyser Software v9.4 (Excel basiert), MRC-Holland <http://old.mlpa.com/coffalyser/download.html>
- dbSNP (Database of single nucleotide polymorphisms) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
- DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) <http://decipher.sanger.ac.uk/>
- DGV (Database of Genomic Variants) <http://dgvbeta.tcag.ca/dgv/app/home?ref=NCBI36/hg18>
- EditPad lite v6.7.0 , Just Great Software Co. Ltd., Rawai, Thailand
- Ensembl <http://www.ensembl.org/index.html>
- GeneCards <http://www.genecards.org/>
- GeneMapper® ID Software v3.2, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- GenomeStudio v2011.1, Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
- Haploview <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>
- HapMap <http://www.hapmap.org>
- HGNC (HUGO Gen Nomenklatur Komitee) <http://www.genenames.org>
- Jmol v13.0 <http://www.jmol.org/>
- KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ) <http://www.genome.ad.jp/kegg>
- MGI (Mouse Genome Informatics database) <http://www.informatics.jax.org/>
- Microsoft® Access 2007, Excel 2007, PowerPoint 2007 und Word 2007, Microsoft, Redmond, Washington, USA
- Microsoft® Windows 7, Windows Vista und Windows XP, Microsoft, Redmond, Washington, USA

- MutationTaster [www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org)
- MutPred <http://mutpred.mutdb.org>
- NanoDrop ND-1000 v3.3.0, Biotechnologie GmbH, Erlangen
- NanoDrop ND-8000 v2.1.0, Biotechnologie GmbH, Erlangen
- NCBI (National Center for Biotechnology Information)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Notepad++ <http://notepad-plus-plus.org/>
- OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man®)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>
- PDB (Protein data bank) <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- Perl 5 <http://www.perl.org/>
- PolyPhen-2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- Primer3 <http://frodo.wi.mit.edu/>
- Pubmed <http://pubmed.com/>
- QuantiSNP v2.0 und 2.2 (Colella et al., 2007)  
<http://www.well.ox.ac.uk/QuantiSNP/>
- Seq Man™ II v5.0, DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA
- Sequencing Analysis Software v5.2.0, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
- UCSC Genome Bioinformatics (Kent et al., 2002) <http://genome.ucsc.edu>
- Universal Protein Resource (UniProt) <http://www.uniprot.org>

## 3.2 Molekularbiologische Untersuchungen

In diesem Kapitel werden die angewandten und genutzten experimentellen Methoden, die die Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit darstellen, vorgestellt.

### 3.2.1 Isolierung genomischer DNA und RNA

Die für die Untersuchung benötigte hochmolekulare DNA wurde aus den kernhaltigen Leukozyten des Probandenblutes bzw. aus den im Speichel befindlichen Leukozyten gewonnen. Venöses Blut wurde mit EDTA-haltigen Monovetten (SARSTEDT AG & Co.)

aufgezogen und bis zur Isolierung der DNA bei -20 °C aufbewahrt. Speichelproben wurden mittels Orangen®-Kits OG-250 und OG-500 (DNA Genotek, OraSure Technologies) gesammelt und bei Raumtemperatur (RT) nach Inkubation bis zur DNA-Isolierung gelagert. Mithilfe von PAXgene® Röhrchen (Qiagen) wurde ebenfalls Blut konserviert und nach 24- bis 72-stündiger Inkubation bei RT bis zur RNA Extraktion bei -80 °C gelagert.

Die DNA-Präparation aus Blut erfolgte nach Herstellervorgaben größtenteils mit dem Chemagic Magnetic Separation Module I v20 (PerkinElmer, Baesweiler) und vereinzelt mit dem „QIAamp DNA Blood Maxi Kit“. Aus Speichel wurde die DNA-Extraktion ebenfalls mit zugehörigem Kit nach Herstellervorgaben durchgeführt. Die RNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des PAXgene® Systems zur Blutentnahme und RNA-Extraktion ebenfalls nach Herstellervorgaben.

### **3.2.2 Konzentrations- und Reinheitsmessung**

Qualität und Quantität von DNA bzw. RNA wurden durch eine spektralphotometrische Messung mit dem NanoDrop® ND-1000 bzw. ND-8000 (Peglab Biotechnologie GmbH) unter Verwendung von 1,2 µl Nukleinsäure pro Messung ermittelt. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Weitere Moleküle wie Proteine, Salze oder Ethanol, die nach der Isolation der DNA/RNA in der Lösung enthalten sein können, haben ein Absorptionsmaximum von 280 nm. Mithilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes lässt sich aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm die Konzentration der Nukleinsäure bestimmen. Das OD-Verhältnis von 260 nm und 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Eine reine DNA-Lösung zeigt ein Verhältnis von 1,8 und eine reine RNA Lösung ein Verhältnis von 2. Eine Kontamination mit anderen Molekülen führt zu einem abweichenden Verhältnis. Die entsprechenden Berechnungen wurden mit der Software NanoDrop 1000 (8000) v.3.7.0 (v.2.1.0) durchgeführt und jeweils mit einer zweiten Messung bestätigt.

Bei Bedarf wurde zusätzlich mittels Gelelektrophorese in einem 0,8 %-igen AgaroseGel (0,64 g Agarose; 80 ml 1 X TBE; 6 µl EtBr) eine Degradierungsanalyse durchgeführt. 100 ng eingesetzte hochmolekulare DNA bildet nach 45 Min bei 100V (400 mA) eine definierte Bande, während hingegen die gleiche Menge degradierte DNA sich auftrennt und ein sogenannter „Schmier“ zu erkennen ist.



### 3.2.3 Fällung von verunreinigter DNA

Bei Bedarf wurde verunreinigte DNA mit Isopropanol gefällt, neu gelöst und erneut photometrisch gemessen. Dafür wurde folgendes Protokoll je 100 µl DNA verwendet:

#### Fällung

- 1 µl Glykogen (20ng) und 10 µl NaAc (3M, pH von 5,2) zur gelösten DNA hinzugeben und gut vortexen,
- 100 µl gekühltes Isopropanol (100%) hinzugeben und gut vortexen,
- 15 Min bei -80 °C kühlen,
- für 30 Min bei 4 °C zentrifugieren und anschließend Überstand abpipettieren.

#### Waschschritt

- 250 µl 70 %-iges EtOH zum Pellet hinzugeben und gut vortexen,
- für 30 Min bei 4 °C zentrifugieren,
- Überstand abpipettieren und Pellet komplett trocknen lassen,
- getrocknetes Pellet in 20 – 50 µl  $Te^{-4}$  aufnehmen und mindestens 8 h bei RT inkubieren.

### 3.2.4 Genomweite SNP-Array Genotypisierung mit Illumina

Für die Genotypisierung wurde die Infinium BeadArray Plattform der Firma Illumina verwendet. Hier werden die Genotypen der einzelnen Marker (i. d. R. SNPs) durch eine allelspezifische Einzelbasenerweiterung (Stemers et al., 2006) ermittelt.

Für die Genotypisierung wurden Chips mit Siliziumkugeln („beads“) verwendet, an die jeweils mehrere hundert, 50 bp lange, markerspezifische Sonden gekoppelt sind. Jeder Marker ist im Mittel 20-fach durch solche Siliziumkugeln auf einem Chip vorhanden (Gunderson et al., 2004). Zusätzlich zur jeweiligen markerspezifischen Sequenz ist jede Kugel mit einer einmaligen Sequenz zur Identifikation gekennzeichnet.

Die Genotypisierung bestand aus vier Schritten (Gunderson et al., 2005; Stemers et al., 2006) und für die Prozessierung der Chips wurde das Herstellerprotokoll verwendet. Dieses Protokoll sieht eine Prozessierung innerhalb von drei Tagen vor.

Am ersten Tag erfolgte die Amplifikation der DNA, für die nur eine relativ geringe Menge genomischer DNA (200 ng in einer 50 ng/μl Verdünnung) benötigt wurde, um qualitativ hochwertige Genotypisierungsdaten zu erhalten.

Die Fragmentierung und Fällung der amplifizierten DNA mit anschließender Hybridisierung auf den jeweils verwendeten SNP-Arrays erfolgte am zweiten Tag. Dafür wurde die amplifizierte DNA zunächst enzymatisch fragmentiert und anschließend präzipitiert und resuspendiert. Daran anschließend erfolgte die spezifische Hybridisierung der DNA an die Sonden der „beads“, deren Sequenz sich jeweils nur in der letzten Base vor dem zu untersuchenden SNP unterscheidet.

Abschließend wurden am dritten Tag die BeadArrays gewaschen und eine Einzelbasenverlängerung mit anschließender Färbung vorgenommen, bevor die fertig prozessierten Chips mithilfe des iScan Scanners von Illumina ausgelesen wurden. Die in mehreren Waschschritten gereinigten hybridisierten DNAs wurden durch eine Polymerase spezifisch um ein komplementäres dideoxy-Nukleotid verlängert.

Um die zu messende Fluoreszenz der SNPs zu verstärken, wurde ein Antikörper Sandwich-Assay verwendet (Pinkel et al., 1986). Die verwendeten ddCTPs und ddGTPs waren mit Biotin markiert, ddATPs und ddUTPs mit 2,4-dinitrophenol (DNP; Steemers et al., 2006). Biotin und DNP wurden dann immunohistochemisch mit Alexa555-markiertem Streptavidin beziehungsweise Alexa647-markierten primären Antikörpern (gewonnen aus Kaninchen) gegen DNP angefärbt. Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit einem zweiten Färbungsschritt, bei dem biotinyliertes anti-Streptavidin und sekundäre anti-Kaninchen-Antikörper (gewonnen aus Ziege) verwendet wurden, abgeschlossen. Um die Sensitivität zu steigern, wurde die Sandwichfärbung zweimal durchgeführt. Nachdem die zweifache Sandwichfärbung abgeschlossen war, wurden die BeadArrays in einem iScan Scanner der Firma Illumina ausgelesen. Die Auswertung der generierten Daten erfolgte mithilfe der GenomeStudio Software (s. Kap. 3.3.1).

In der vorliegenden Arbeit mussten folgende vier unterschiedliche SNP-Arrays verwendet werden, da kontinuierlich die SNP-Arrays weiter entwickelt und jeder Chiptyp nur in bestimmten Mengen von Illumina produziert wurde:

- HumanHap550v3 (HH550),
- Human610-Quad (H610Q),
- Human660W-Quad (H660W) und

- HumanOmni1-Quad (OMNI).

Die Auswahl der Marker auf diesen Chips wurde, mit steigender Marker-Anzahl pro Array-Generation, von Illumina vorgenommen: Tab. 4 stellt die technischen Details dar.

**Tab. 4: Technische Details der verwendeten SNP-Arrays**

	<b>HH550</b>	<b>H610Q</b>	<b>H660W</b>	<b>OMNI</b>
<b>Anzahl Marker</b>	561.466	620.901	657.336	1.140.419
<b>Anzahl der SNPs innerhalb von 10 Kb eines RefSeq-Gens</b>	252.793	309.978	332.756	618.959
<b>Mittelwert des Abstandes zwischen zwei Markern [in Kb]</b>	5,3	4,7	4,4	2,4
<b>Median des Abstandes zwischen zwei Markern [in Kb]</b>	2,9	2,7	2,3	1,2
<b>Durchschnittliche technische Auflösung (5 konsekutive Marker) [in Kb]</b>	26,5	23,5	22	12

Die Selektion der Marker fand unter Berücksichtigung der Daten aus dem HapMap Projekt (International HapMap Consortium, 2005, 2007) und vom Wellcome Trust Case Control Consortium (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007) statt.

### 3.2.5 Multiplex ligations-abhängige Sondenamplifikation (MLPA)

Bei der multiplex ligations-abhängigen Sondenamplifikation (MLPA; multiplex ligation-dependent probe amplification) handelt es sich um eine Multiplex-PCR-Methode zur Detektion von CNVs. Hierbei wird nicht die DNA der zu untersuchenden Probe, sondern die zu der Probe hinzugefügten Sonden werden amplifiziert, gemessen und gegen eine Referenz verglichen (Schouten et al., 2002). MLPA-Analysen der chromosomalen Region 22q11.21 wurden zur Verifikation von detektierten CNVs, zur Segregationsanalyse sowie zur gezielter CNV-Analyse bei knapp 300 BEEK-Patienten eingesetzt.

Die MLPA-Reaktion kann in fünf Hauptschritte unterteilt werden: Zunächst erfolgt eine 1) DNA-Denaturierung und -Hybridisation der MLPA-Sondenpaare an die Template-DNA (MLPA-„probes“). Daran schließt sich 2) eine Ligations- und 3) PCR-Reaktion der Sondenpaare an. Im vierten Schritt werden die 4) amplifizierten und unterschiedlich langen Sondenpaare durch eine Gelelektrophorese im 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation) separiert und abschließend erfolgt 5) die Datenanalyse und

Interpretation mittels dem Excel-(Microsoft®) basierten Auswerteprogramm Coffanalyser (MPC-Holland).

Verwendet wurde in der vorliegenden Arbeit nach Herstellervorgaben das kommerzielle Kit SALSA MLPA KIT P250-A1 DiGeorge (MRC-Holland). Es beinhaltet 48 MLPA-Sondenpaare und 16 unterschiedliche Kontrollfragmente (Jalali et al., 2008). Abb. 9 illustriert an einer detektierten Duplikation die Coffanalyser-basierte Auswertung der MLPA-Methode.

### **3.2.6 Auswahl der Oligonukleotidsequenzen (Primer-Design)**

Für die meisten Applikationen müssen die Oligonukleotide (Primer) zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. der Sequenzierung genau komplementär zur DNA-Vorlage sein. Im Allgemeinen sind für die Konstruktion solcher Oligonukleotide folgende Richtlinien zu beachten:

1. Eine Folge von drei oder mehr G- oder C-Basen am 3'-terminalen Ende des Primermoleküls sollte vermieden werden, da andernfalls eine unspezifische Anlagerung des Primers erfolgen könnte.
2. Da ein Thymin am 3'-terminalen Ende eher zu Falschpaarungen führt als ein anderes Nukleotid an dieser Position (Kwok et al., 1990), sollte diese Konstellation ebenso umgangen werden.
3. Die Primerpaare sollten so beschaffen sein, dass die Sequenzen an ihren 3'-Enden weder inter- noch intramolekular komplementär sind. Damit wird vermieden, dass sich Primerdimere ausbilden.
4. Ein Primer sollte zwischen 18 und 25 Nukleotide lang sein. Dies ermöglicht eine spezifische Hybridisierungstemperatur.
5. Nach Möglichkeit sollten alle vier Basen in den Primern gleich häufig vertreten sein.
6. Die beiden Primer sollten in einem Abstand von weniger als 10 Kb an die DNA-Matrize binden, da sich bereits 3 Kb große Amplikons weniger gut vervielfältigen lassen (Jeffreys et al., 1988).

### 3.2.7 DNA-Amplifikation (Polymerase-Kettenreaktion; PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist die spezifische, enzymatische *in vitro* Amplifikation eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden (Saiki et al., 1985, 1988; Mullis & Faloona, 1987). Voraussetzung für die Anwendung der PCR ist die Kenntnis der Sequenz, die das gewünschte DNA-Fragment flankiert, damit geeignete Primer synthetisiert werden können. Durch zyklische Wiederholung von verschiedenen Inkubationsschritten kann das DNA-Fragment theoretisch beliebig oft kopiert werden.

#### 3.2.7.1 PCR-Reaktionsansätze

Alle Reaktionen wurden in dünnwandigen, autoklavierten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Bei mehreren Ansätzen mit unterschiedlicher DNA, aber gleichen Amplifikationsprimern, wurde zunächst eine Stammlösung („Mastermix“), bestehend aus der Gesamtmenge Primer, dNTP-Mix, Puffer, DMSO (optional) und Wasser, angesetzt, gevortext und abzentrifugiert. Nach Zugabe der Taq-Polymerase zum Mastermix, welche auf Eis erfolgt, wurde dieser erneut gevortext und die entsprechende Menge der DNA hinzugefügt. Umgekehrt wurde bei mehreren Ansätzen mit der gleichen DNA, aber unterschiedlichen Amplifikationsprimern die DNA im Mix vorgelegt und die Primer erst kurz vor Amplifikationsbeginn zugesetzt. Die Amplifikation selbst wurde in den Thermozyclern PTC 100/PTC 200 (MJ Research) sowie C1000™/S1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt.

Es wurden drei unterschiedliche Taq-Polymerasen, je nach Fragestellung und Eigenschaft des PCR-Produktes, verwendet.

Tab. 5: PCR-Reaktionsansätze für unterschiedliche Taq-Polymerasen

	VWR-Taq DNA-Polymerase (VWR)	HotStar Taq DNA-Polymerase (Qiagen)	Expand™ Long Template PCR System (Roche)
DNA (20-100 ng)	1,0	1,0	1,0
Primer F (10 pmol)	1,0	1,0	1,0
Primer R (10 pmol)	1,0	1,0	1,0
dNTP-Mix	0,5	0,5	0,5
10x Puffer	2,5	2,5 (15mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 (Puffer 1)
Taq <sup>1</sup>	0,2	0,2	0,4
DMSO (optional)	1,25	1,25	1,25
Destilliertes Wasser	Ad 25	Ad 25	Ad 25

Alle Angaben in µl.

Tab. 5 fasst die unterschiedlichen Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 25 µl zusammen.

### 3.2.7.2 PCR-Reaktionsbedingungen

Die Thermozykler wurden spezifisch für die verwendete *Taq*-Polymerase, Amplikonlänge und Primern nach den angegebenen Reaktionsprotokollen programmiert (vgl. Tab. 6, Tab. 7 und Tab. 8).

**Tab. 6: Standard-PCR-Programm TD100**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sec]
1	95	300
2	95	30
3	63 - 55*	30
4	72	60 Sec/Kb
5	72°C	600
6	12	unendlich

\*Initiale Annealing-Temperatur bei 63 °C für drei Zyklen (Schritte 2 - 4), anschließend jeweils alle drei Zyklen ein °C kälter, 15 Zyklen am Ende bei der Annealing-Temperatur von 55 °C.

**Tab. 7: PCR-Programm CN Hot**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sec]
1	95	900
2	95	20
3	primerspezifisch	30
4	72	60sec/kb
5	72°C	180
6	12	unendlich

Optimiertes Programm für die HotStar *Taq* DNA-Polymerase; 34 Wiederholungen der Schritte 2 – 4.

**Tab. 8: PCR Programm CN (temperatur- und größenspezifisch)**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sec]
1	94	240
2	94	30
3	primerspezifisch	30
4	72	60sec/kb
5	72°C	600
6	12	unendlich

34 Wiederholungen der Schritte 2 – 4.

Bei den aufgeführten Zeiten handelt es sich um „Nettozeiten“, d. h. sie gelten ab Erreichen der jeweiligen Zieltemperatur, wobei die Geräte einen schnellen Temperaturwechsel ( $> 1\text{ °C/s}$ ) gewährleisten. Nach einer initialen Denaturierungsphase bei 95 °C schlossen sich mit 34 Wiederholungen die Inkubationsschritte Denaturierung, Annealing und Elongation an. Nach Ablauf des letzten Zyklus schloss sich eine

Extensionsphase an. So sollte eine möglichst vollständige Überführung der „primer“-assozierten Template-DNA in Zielprodukt (Amplikon) gewährleistet werden. Anschließend wurden die Proben bis zur Entnahme auf 12 °C heruntergekühlt. Die unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (Schritt 3) und Elongationszeiten (Schritt 4) sind primerspezifisch entsprechend im Anhang aufgeführt.

### 3.2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung, Trennung und selektiven Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt (Aaij & Borst, 1972; Meyers et al., 1976).

Bedingt durch ihre negative Eigenladung wandert lineare, doppelsträngige DNA in polymerisierter Agarose bei einer angelegten Spannung von nicht mehr als 5 V/cm umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht in Richtung Anode. Durch die Wahl der Agarosekonzentration, der Pufferbedingungen, der angelegten Spannung sowie der Zeit kann die elektrophoretische Mobilität so variiert werden, dass für die erwarteten DNA-Fragmente eine optimale Trennung erzielt wird. Der gelösten Agarose wurde der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt (Sharp et al., 1973). Die Banden werden dadurch mithilfe von UV-Licht (366 nm) sichtbar, da EtBr in doppelhelikaler DNA interkaliert (Waring, 1965).

Alle Elektrophoresen wurden in Horizontal-Apparaturen (WIDE MINI-SUB® CELL GT und Sub-Cell Model 96, Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße wurden 0,8 bis 2 %-ige Agarosegele im Elektrophoresepuffer (1 X TBE) verwendet. Die benötigte Agarosemenge für kleine (bzw. große) Gele wurde in destilliertem Wasser durch mehrmaliges Aufkochen im Mikrowellenherd (MW 9625, SEVERIN Elektro) gelöst. Nach Abkühlen auf 40 bis 50 °C wurden 80 ml (240 ml) 1 X TBE-Puffer und 6 µl (18 µl) EtBr-Stammlösung zugesetzt und die Lösung in einen geeigneten Gelträger gegossen und nach 30-minütigem Abkühlen in der mit 1 X TBE gefüllten Kammer platziert. Die Dichte der zu pipettierenden DNA-Menge wurde mit 1 X Blaupuffer erhöht und anschließend aufs Gel aufgetragen.

Die Fragmentgröße sowie die DNA-Konzentration lassen sich unter UV-Licht durch Vergleich mit einem gesondert in eine Geltasche aufgetragenen DNA-Längenstandard abschätzen. Zur Dokumentation wurde das Gel Doc™ XR System (Bio-Rad Laboratories GmbH) eingesetzt.

### 3.2.8 Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR) wurde zur Verifikation der Kopienzahlveränderungen und Segregationsanalyse genutzt. Der prinzipielle Ablauf gleicht der beschriebenen PCR (Kapitel 3.2.7). Ein wichtiger Unterschied ist die Zugabe von SYBR Green zum Reaktionsgemisch, ein asymmetrischen Cyanin-Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert (Wittwer et al., 1997). Durch diese Interaktion erhöht sich nach jedem Amplifikationszyklus die detektierbare Fluoreszenzintensität, die gemessen wird.

Durchgeführt und analysiert wurden die Reaktionen in einem ABI Prism®7900HT Fast Real-Time PCR System (TaqMan) von Life Technologies Corporation. Dieses misst die vorhandene Fluoreszenz nach jedem Zyklus und bildet den Ct-Wert (Cycle Threshold). Der Cycle Threshold ist der Zyklus bzw. Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenzzunahme die exponentielle Phase erreicht und sich von der Hintergrundfluoreszenz absetzt. Der Ct-Wert wird anhand eines Schwellenwertes, der für alle Proben gleich ist, automatisch ermittelt.

#### 3.2.8.1 qPCR-Reaktionsansatz und-bedingungen

Die verwendeten Primer wurden nach Möglichkeit in kodierenden Genabschnitten und ausschließlich mit in Tab. 9 aufgeführten Parametern in Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entworfen. Alle anderen Kriterien wurden entsprechend Kapitel 3.2.6 berücksichtigt.

**Tab. 9: Primer3-Parameter zur Auswahl der qPCR Primer-Paare**

	Minimum	Optimum	Maximum
PCR Produktgröße [bp]	120		150
Länge der Primer [b]	18	20	27
Schmelztemperatur [C]	57	60	61
GC-Gehalt [%]	20	40	60

Alle Primerpaare wurden zunächst unter Verwendung einer Kontroll-DNA durch eine PCR getestet und auf ein Agarosegel aufgetragen. Da SYBR Green in jede doppelsträngige DNA interkaliert, sollte so eine Verfälschung der qPCR-Analyse aufgrund von Primer-Dimeren vermieden werden.



Die qPCR-Experimente wurden jeweils in einer 384er Mikrotiterplatte durchgeführt. So konnte der minimale Reaktionsansatz von 10 µl realisiert werden (s. Tab. 10).

**Tab. 10: 10 µl qPCR-Reaktionsansatz mit SYBR Green**

	<b>Menge [µl]</b>
<b>DNA (10 ng/µl)</b>	2,0
<b>Primer F (50 pmol)</b>	0,4
<b>Primer R (50 pmol)</b>	0,4
<b>SYBR Green Master Mix</b>	5,0
<b>Destilliertes Wasser</b>	Ad 10

### **3.2.8.2 Schmelzkurve**

SYBR Green interkaliert unspezifisch in jede doppelsträngige DNA. Daher ist es besonders wichtig, spezifische Primer auszuwählen, um die Bildung von Primer-Dimeren zu vermeiden. Zur Überprüfung der Spezifität der Ergebnisse wird am Ende jeder PCR zusätzlich eine Schmelzkurve ermittelt. Dazu wird die Temperatur erhöht, bis die DNA an einem spezifischen Schmelzpunkt schmilzt und SYBR Green I freigesetzt wird. Die dadurch entstehenden Fluoreszenzunterschiede werden gemessen. In Abhängigkeit von der Größe des DNA-Abschnittes und seines GC-Gehalts unterscheiden sich die Schmelztemperaturen verschiedener DNA-Abschnitte. Anhand der Schmelzkurven kann analysiert werden, wie lang das amplifizierte DNA-Produkt ist und wie viele verschiedene DNA-Produkte in der Reaktion entstanden sind. Befinden sich unspezifische Nebenprodukte in der Reaktion, so erkennt man dies am Vorliegen von zusätzlichen Fluoreszenzspitzen in der Schmelzkurve.

### **3.2.8.3 Auswertung $\Delta\Delta C_t$ -Methode**

Ausgewertet wurden die Daten mithilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Diese Methode wurde am Institut für Humangenetik in Bonn von Herrn Alexander Zink etabliert und an dieser Stelle vorgestellt. Bei jeder Art von qPCR ist genaues Arbeiten essentiell, da schon geringe Konzentrationsunterschiede zwischen DNA von Patienten und Kontrollpersonen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können. Trotz genauen Arbeitens sind jedoch Pipettierfehler und Konzentrationsunterschiede nicht ganz zu vermeiden. Daher wurden zur Kalibrierung der Ergebnisse endogene Kontrollen (HKGs=House Keeper Genes) benutzt. Diese internen Kontrollen sollten mit einer hohen

Wahrscheinlichkeit in zwei Kopien im Genom vorliegen und ubiquitär exprimiert werden. In der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurde daher der Ct-Wert der internen Kontrolle vom Ct-Wert der Zielsequenz subtrahiert. ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_Z - \text{Ct}_{\text{HKG}}$ ). Dies diente der Normalisierung der Ergebnisse. Während dieser Arbeit wurden *BNC1* (basonuclin 1), *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) und *RPP38* (ribonuclease P/MRP 38kDa subunit) als interne Kontrollen benutzt (s. Anhang A). Jeder Messwert wurde gegen alle drei internen Kontrollen normalisiert.

Der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert ist für eine Aussage über die Kopienzahl eines DNA-Abschnittes ohne Bezug zu einem Vergleichswert noch nicht ausreichend. Daher wurde der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert des Patienten ( $\Delta\text{Ct}_P$ ) mit dem  $\Delta\text{Ct}$ -Wert mindestens einer phänotypisch unauffälligen Person (Referenz,  $\Delta\text{Ct}_R$ ) verrechnet ( $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_P - \Delta\text{Ct}_R$ ).

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  ergab die Anzahl an DNA-Zielabschnitten in der qPCR nach Normalisierung mit einer endogenen Kontrolle und im Verhältnis zu einer Referenz.

Die Multiplikation  $2 \times 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  ergab die relative Kopienzahl des gesuchten DNA-Abschnittes im Genom des Patienten im Verhältnis zu einer phänotypisch unauffälligen Person. Es ist überaus wichtig, dass die so ermittelte Kopienzahl relativ und nicht absolut zu interpretieren ist. Hatten sowohl Patient als auch Referenz drei Kopien eines DNA-Abschnittes, ergab sich mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode die relative Kopienzahl von zwei. Um möglicherweise daraus resultierende Fehler zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit mit insgesamt vier Kontrollpersonen verglichen.

### 3.2.9 Automatisierte Sanger-Sequenzierung

Sanger-Sequenzierungen wurden nach dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Verfahren des gezielten Kettenabbruchs von enzymatisch hergestellten DNA-Kopien benannt (Sanger et al., 1977). Einzelsträngige DNA wird mithilfe eines Primers in Gegenwart von DNA-Polymerase und den vier dNTPs analog einer PCR gezielt kopiert (McBride et al., 1989). Bei diesem als „cycle-sequencing“ bezeichneten Verfahren führt der Einbau von Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs), die im Ansatz als limitierendes Reagenz vorhanden sind, zu einer zufälligen Termination der Polymerisierungsreaktion. Somit entsteht ein Gemisch unterschiedlich langer DNA-Ketten mit den entsprechenden ddNTPs an den Strangenden. Dieses Verfahren wurde so modifiziert, dass im Gegensatz zur herkömmlichen Methode, bei der die Primer

radioaktiv markiert sind, fluoreszenzmarkierte ddNTPs eingesetzt werden (Smith et al., 1986). Da diese „Terminatoren“ (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) mit verschiedenen Farbstoffen markiert sind, die jeweils bei einer anderen Wellenlänge fluoreszieren, kann diese Reaktion auch in nur einem Ansatz stattfinden.

Die neu synthetisierten DNA-Fragmente werden durch Hitzedenaturierung von der DNA-Matrix getrennt und in Gegenwart vom Polymer im Sequenzierungsapparat 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation) elektrophoretisch aufgetrennt. Im Gel werden die mit den vier verschiedenen Fluoreszenzmarkern sequenzierten Proben in einer Kapillare aufgetrennt. In Form einzelner basenspezifischer Farbsignale passieren die Fragmente die Detektionsfront und werden direkt weiterverarbeitet und in Form eines Chromatogramms mit zugeordneten Basen gespeichert.

### 3.2.9.1 Probenvorbereitung und Primer für die Sanger-Sequenzierung

Amplifizierte PCR-Produkte wurden zunächst nach Herstellervorgaben mit dem AMPure Kit (Agencourt Bioscience Corporation) aufgereinigt. Für die Sanger-Sequenzierungsreaktion konnte anschließend (wenn nicht anders angegeben) ein normaler PCR-Primer als Sequenzierprimer genutzt werden (s. Anhang).

### 3.2.9.2 Sanger-Sequenzierungsansatz und -Reaktionsbedingungen

Da es sich beim „cycle-sequencing“ um eine PCR-analoge Reaktion handelt, konnten die gleichen Thermozykler wie bei der PCR benutzt werden. Es wurde ein 20 µl Ansatz bestehend aus den in Tab. 11 aufgeführten Komponenten verwendet.

Tab. 11: Sanger-Sequenzierungsansatz

	Menge [µl]
Amplifiziertes PCR-Produkt	1,0
Primer F (3,2 pmol)	1,0
5x Sequencing Puffer	3,75
BigDye 3.1 Mastermix	0,5
Destilliertes Wasser	Ad 20

Nach einer dreiminütigen Denaturierungsphase bei 95 °C wurden insgesamt 20 Wiederholungen der Reaktionsschritte Denaturierung, Annealing und Primer-Extension

mit Kettenabbruch durchgeführt und nach Ende des letzten Zyklus auf 12 °C herunter gekühlt (s. Tab. 12).

**Tab. 12: Standardbedingungen für die „cycle-sequencing“-Reaktion**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Sec]
1	95	60
2	95	10
3	50	5
4	60	240
5	72°C	600
6	12	unendlich

24 Wiederholungen der Schritte 2 – 4. Abweichende Anneling- und Primer-Extensions mit Kettenabbruch-Temperatur sind im Anhang entsprechend aufgeführt.

### 3.2.9.3 Vorbereitung, Auftrennung und Verarbeitung der Sequenzierfragmente

Die Sequenzierungsfragmente wurden anschließend nach Herstellervorgaben mit dem CleanSEQ Kit (Agencourt Bioscience Corporation) aufgereinigt. 6 µl aufgereinigtes Fragment wurde mit 6 µl HPLC-Wasser verdünnt und im 16-Kapillar-Sequenzierautomat 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation) sequenziert. Das emittierte Fluoreszenzsignal wurde dabei auf den angeschlossenen Computer übertragen und gespeichert. Dabei wurden mit der 3130xl Data Collector Software (Life Technologies Corporation) editierbare Chromatogramme sowie Sequenzdaten generiert, die auf einem anderen Computer mithilfe der Software Seq Man II (DNASTAR Inc.) analysiert wurden.

### 3.2.10 Next Generation Sequencing (NGS)

Die Ergebnisse der drei im Augenblick dominierenden NGS-Instrumente wurden in dieser Arbeit zu weiteren Analysen genutzt und werden im Folgenden kurz vorgestellt. In der Übersichtsarbeit von Metzker (2010) findet sich eine detaillierte Darstellung und Beschreibung dieser und weiterer, wenig verbreiteter Verfahren. Die Hauptunterschiede dieser drei Methoden sind unterschiedliche Kosten pro Base sowie die Generierung unterschiedlicher Leselängen, Fehlerraten sowie Fehlerprofile relativ zur Sanger-Sequenzierung und im Vergleich untereinander (Zhang et al., 2011). Übersichts-Tab. 13 vergleicht die technischen Merkmale.

**Tab. 13: Vergleich der drei verwendeten am Markt dominierenden NGS-Technologien**

Technologie	Amplifikation	Maximale	Datendurchsatz	Sequenzierung
-------------	---------------	----------	----------------	---------------

Sequenzlänge				
Roche 454 GS FLX Titanium XLR70 <sup>1</sup>	Emulsions-PCR	600 Bp	450 Mb in 10 Stunden	Pyrosequenzierung
Illumina (Solexa) GAII <sup>2</sup>	Brücken-PCR	2x150 Bp	54-60 Gb in 14 Tagen	Polymerase-basiert Sequenzierung während der Synthese
ABI SOLiD V4-Sequenzierer <sup>3</sup>	Emulsions-PCR	75x35 Bp	10-15 Gb pro Tag	Sequenzierung während der Ligation
Herstellerangaben [Stand 26.12.2012] 1: <a href="http://454.com/products/gs-flx-system/index.asp#performance-tabling">http://454.com/products/gs-flx-system/index.asp#performance-tabling</a> ; 2: <a href="http://www.illumina.com/systems/genome_analyzer_iix/performance_specifications.ilmn">http://www.illumina.com/systems/genome_analyzer_iix/performance_specifications.ilmn</a> ; 3: <a href="http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems.html">http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems.html</a> .				

Die kosteneffizienteste Strategie, mit gleichzeitig gesteigerter Effektivität zur Erhebung von NGS-Daten, war eine Anreicherung spezifischer Regionen (Bau et al., 2009; Ng & Kirkness, 2010; Rehman et al., 2010; Volpi et al., 2010), um daraus Ergebnisse für die vorliegende Arbeit zu generieren. Zum einen wurde für eine zielgerichtete Sequenzierung der Fokus auf alle proteinkodierenden Sequenzen (das funktionelle Exom; kurz: Exomsequenzierung) gelegt, da dafür nur etwa 5 % im Vergleich zum gesamten humanen Genom sequenziert werden müssen (Pussegoda, 2010; Senapathy et al., 2010). Dieser Ansatz verfolgt die generelle Detektion von krankheitsrelevanten Kandidatengenen. Zur Anreicherung wurde dabei von den Kooperationspartnern in Kiel und in Köln das kommerzielle SureSelect Human All Exon (38 MB) (Kit Agilent Technologies) eingesetzt. Zum anderen wurde eine zielgerichtete Sequenzierung einer ganzen krankheitsassoziierten Region (Kapitel 4.1.2.1) angestrebt, da sowohl alle involvierten Gene als auch die nicht kodierenden Bereiche analysiert werden sollten. Hier wurde von den Kooperationspartnern in Berlin eine Anreicherung der spezifischen Region mit dem kommerziellen System NimbleGen Sequence Capture (Roche) vorgenommen.

### 3.2.10.1 Roche 454 GenomeSequencer FLX (GS-FLX) Titanium Instrument

Der 454 GS (Roche) war im Jahr 2005 als erste kommerzielle Methode am Markt (Margulies et al., 2005) und ging aus 20-jährigen Vorarbeiten hervor (Nyrén & Lundin, 1985; Hyman, 1988; Ronaghi et al., 1996). Dem System liegt eine hochparallelisierte Pyrosequenzierung zu Grunde. Dabei wird bei der Synthese des zu untersuchenden

DNA-Stranges nach jedem Nukleotideinbau Pyrophosphat freigesetzt und die hervorgerufene Lichtreaktion gemessen.

In einer Wasser-Öl-Emulsions-PCR werden dafür zunächst Adapter-ligierte DNA-Fragmente einer bestimmten Größe amplifiziert. In jedem Öltröpfchen befindet sich jeweils eine winzige Kugel mit daran gebundenen spezifischen Primern, so dass parallel viele einzelne PCR-Reaktionen ablaufen. Die an diese Kügelchen gebundenen amplifizierten Produkte werden anschließend vom Öl gereinigt und in einen Glasfaserchip (PicoTiter-Platte) platziert. Eine Mischung von Enzymen (u. a. DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase und Luciferase) wird hinzugegeben und zur Sequenzierung im GS FLX System platziert. Die Platte wird anschließend zyklisch in definierter Reihenfolge mit Nukleotiden geflutet und die beim Nukleotideinbau freigesetzte Lichtintensität gemessen.

Diese Methode stellt die qualitativ beste, aber auch kostenintensivste Methode dar. Da damit auch die längsten Sequenzen generiert werden können, ist sie besonders für die Bruchpunktdetektion geeignet (Droege & Hill, 2008). Die NGS-Analyse mit dem 454 GS FLX wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Bernd Timermann (Next Generation Sequencing Gruppe, MPI für Molekulare Genetik, Berlin) durchgeführt.

### **3.2.10.2 Illumina (Solexa) Genome Analyzer (GA)**

Die Solexa Sequenzierungsplattform wurde im Jahr 2006 kommerzialisiert und von Illumina im Frühjahr 2007 erworben (Bennett, 2004; Bentley, 2006; Bentley et al., 2008).

Die Sequenzierungsmethode basiert zum einen auf einer reversiblen Farbstoff-Terminatoren-Nukleotid-Technologie. Zum anderen werden klonale Sequenzen, jeweils zu einem Cluster zusammengefasst, amplifiziert (bridge amplification). Bei diesem Verfahren werden die amplifizierten DNA-Moleküle durch fixierte Primer zuerst auf einer Fließzelle (flow cell) immobilisiert und auch das freie Ende wird durch eine Adaptersequenz an die Matrix gebunden. Um die an beiden Enden fixierte Sequenz zu determinieren, werden vier unterschiedliche fluoreszenzmarkierte reversible Terminator-Nukleotide hinzugegeben und erneut amplifiziert. Dies ist notwendig, um im Sequenzierungsprozess eine ausreichende Signalintensität zu erreichen, die von einer

Kamera im GA detektiert werden kann, um daraus die amplifizierte Sequenz ermitteln zu können.

Diese Methode ist kosteneffizienter, aber im Vergleich zur 454-Technologie zeitintensiver. Die verhältnismäßig schlechtere Qualität der detektierten einzelnen Sequenzen wird quantitativ ausgeglichen. Die NGS-Analyse mit dem GAI wurde am Cologne Center for Genomics (CCG) unter Leitung von Herrn Prof. Peter Nürnberg (Universität zu Köln) durchgeführt.

### **3.2.10.3 Applied Biosystems (ABI) SOLiD System**

Das SOLiD Sequencing System wurde Ende 2007 eingeführt und basiert auf dem Hybridisierungs-Ligations-Prinzip (Shendure et al., 2005; Valouev et al., 2008).

DNA-Fragmente werden in kleinen Öl-Tröpfchen zusammen mit Adapterkügelchen und den Amplifikationsreagenzien eingeschlossen und amplifiziert. Nach dieser Emulsions-PCR wird die amplifizierte DNA, die an die Adapterkügelchen gebunden ist, auf einem Glasträger fixiert und an Ankerprimer hybridisiert. Nach Zugabe von Oligonukleotid-Oktameren, die unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind, findet parallel eine zyklische Ligation statt. Hierbei wird die Fluoreszenzintensität kontinuierlich im ABI SOLiD Sequencing System gemessen, wodurch die Sequenz ermittelt werden kann.

Als Nachteil werden die kurzen Sequenzenabschnitte gesehen, der aber durch das Abgleichen gegen bekannte Sequenzen, wie es beim humanen Genom größtenteils möglich ist, kompensiert werden kann. Die im Vergleich zur 454-Technologie geringe Qualität wird, wie bei der Solexa-Technologie, durch Quantität kompensiert und stellt zudem eine weniger kostenintensive Methode dar. Durchgeführt wurden die Analysen unter Verwendung des SOLiD Systems am Institut für Klinische Molekularbiologie unter Leitung von Prof. Andre Lange an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel.

### **3.2.11 Ganzpräparat *in situ* Hybridization (WISH)**

Die Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung (WISH; whole-mount *in situ* Hybridization) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Bernhard G. Hermann (Abteilung für Entwicklungsgenetik, MPI für Molekulare Genetik, Berlin) nach Standardprotokoll

(Chotteau-Lelièvre et al., 2006) durchgeführt. Die WISH diente dem Nachweis einer Genexpression im krankheitsrelevanten uro-rektalen Gewebe von Mausembryonen. Dazu hybridisierten künstlich hergestellte Sonden an die gewünschte mRNA des jeweils zu untersuchenden Gens.

### **3.2.12 Powerplex® 16-System zur Bestätigung der Elternschaft**

Im menschlichen Genom finden sich in vielen Bereichen hintereinander gelagerte Wiederholungen von kurzen Nukleotidmotiven, sogenannte Mikro-Satelliten (STR; short tandem repeats). Besonders polymorphe längere STRs helfen die Vererbung eines Allels nachzuweisen. Das PowerPlex® 16-System (Promega) ist ein Multiplex-STR-System für eine solche DNA-Typisierung und kann mit einer 99 %-igen Wahrscheinlichkeit eine mögliche Elternschaft abklären. Das System ermöglicht eine Co-Amplifikation von sechzehn Regionen unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern.

Nach Herstellervorgaben wurden alle sechzehn Regionen gleichzeitig in einem einzigen Reaktionsgefäß amplifiziert. Die unterschiedlich großen Amplikons wurden anschließend mit dem 3130xl Genetic Analyzers (Life Technologies Corporation) aufgetrennt. Eine automatische Zuweisung der Genotypen der Patienten und deren Eltern erfolgte anschließend mit der Genotyper®-Software (Life Technologies Corporation).

### **3.2.13 Auswahl der Verifikationsmethoden**

Jeder mittels SNP-Array (Kapitel 3.2.4) detektierte und priorisierte CNV wurde durch qPCR-Experimente (Kapitel 3.2.8) verifiziert. Dabei wurde (wenn DNA der Eltern vorhanden war) gleichzeitig eine Segregationsanalyse durchgeführt. Es wurden für jeden zu überprüfenden CNV jeweils drei spezifische Sonden ausgewählt, die repräsentativ am Anfang, in der Mitte und am Ende der zu detektierenden Region platziert wurden. Als Sonde wird die zu amplifizierende Sequenz eines qPCR-Primerpaars verstanden. Diese flexible Methode stellt bei der Analyse von Einzelfamilien das kostengünstigste Verfahren dar. Obwohl der Bedarf an DNA und der Zeitaufwand größer ist, überwiegt der Kostenvorteil im Vergleich zu alternativen Analysemethoden.



Abweichend hiervon wurde der Erstbefund auf Chromosom 22 in der Region 22q11.21 mittels MLPA (Kapitel 3.2.5) verifiziert und hinsichtlich der Vererbung analysiert. Grund war zum einen die Verfügbarkeit eines kommerziellen Kits für diese Region und die damit verbundene Reduktion der Kosten, des Zeitaufwandes und des DNA-Verbrauchs.

Aberrationen in der genetischen Region 22q11.21 wurden bei den Folgeuntersuchungen in der BEEK-Kohorte zunächst mithilfe von MLPA-Analysen detektiert und identifizierte Mikroduplikationen bei den Eltern ebenfalls mittels MLPA untersucht sowie beim Patienten mittels einem SNP-Array verifiziert, um die Bruchpunkte genauer eingrenzen zu können (Kapitel 3.2.4).

### **3.3 Bioinformatische und statistische Methoden**

Dieses Kapitel stellt Methoden und Programme vor, die zur weiterführenden Analyse von CNV- und Sequenzierungsbefunden zum Einsatz gekommen sind.

#### **3.3.1 GenomeStudio (GS)**

GenomeStudio (GS) ist ein von der Firma Illumina entwickeltes Softwarepaket. Damit können die generierten SNP-Array-Daten (Kapitel 3.2.4) ausgewertet werden.

Grundlage für die Analysen sind die gemessenen Intensitäten der beiden Allele: dabei unterscheidet GS bei einem Marker nur zwischen A- und B-Allel. Das A-Allel entspricht den rot markierten Nukleotiden A oder T und das B-Allel den grün markierten Nukleotiden G oder C. Diese Rohwerte werden in fünf Schritten normalisiert (Peiffer et al., 2006) und bilden die Grundlage für die Interpretation der genotypisierten Daten. Aus den normalisierten Intensitätsdaten können die relevanten Daten für die CNV-Analyse ermittelt werden. Dabei handelt es sich um die B-Allel Frequenz (BAF) und das Log-R Ratio (LRR).

##### **3.3.1.1 B-Allel Frequenz (BAF)**

BAF beschreibt den Genotyp eines Markers einer Person. Nach der Normalisierung der Rohdaten erfolgt eine Auftragung in einem polaren Koordinatensystem zusammen mit

dem Referenzdatensatz von Illumina (Peiffer et al., 2006). Proben mit gleichem Genotyp (AA, AB oder BB) werden zu Clustern zusammengefasst. Die BAF einer Probe ist die Winkelabweichung eines Signals vom reinen A-Allel-Signal für den jeweiligen Marker, korrigiert für die Position der Probe innerhalb des Genotyp-Clusters. Die BAF gibt damit die allelische Zusammensetzung mit einem kontinuierlichen Wert zwischen 0 und 1 an.

Dabei hat der Genotyp AA eine BAF von 0, der Genotyp AB eine BAF von 0,5 und BB einen Wert von 1. Die experimentell ermittelten Werte können leicht von diesen theoretischen Werten abweichen.

### **3.3.1.2 Log-R-Ratio (LRR)**

Das Log-R-Ratio (LRR) ergibt sich aus dem Verhältnis der gemessenen Intensität der jeweiligen Probe zu einer Referenz von Illumina (Peiffer et al., 2006). Die Intensität spiegelt das gemessene Fluoreszenzsignal wider. Ein LRR von 0 impliziert demnach eine gleich gemessene Intensität im Vergleich zur Referenz. Wird bei einer Probe ein Marker vergleichsweise mit einer höheren (niedrigeren) Intensität gemessen, wird ein LRR größer (kleiner) 0 ermittelt. Auch diese theoretischen Werte sind experimentellen Schwankungen unterworfen.

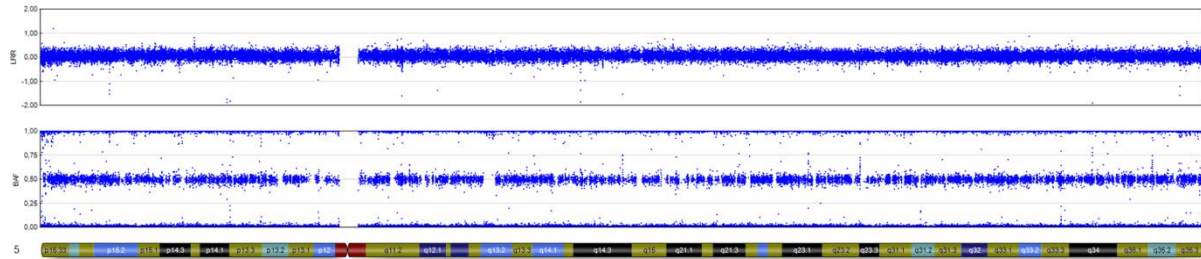
### **3.3.1.3 CNV Detektion in GS**

Die beiden zuvor beschriebenen Werte BAF und LRR lassen in Kombination eine Interpretation hinsichtlich der Kopienzahl der zu untersuchenden Probe zu.

Liegt keine Veränderung der Kopienzahl (i. d. R. zwei Kopien) im Vergleich zur Referenz einer zu untersuchenden Probe vor, streut die BAF in drei Clustern um 0, 0,5 und 1 und das LRR um 0. Dies veranschaulicht die GS-Abbildung (s. Abb. 6).

Bei einer Deletion in einer untersuchten Probe ist die Zahl der Allele in der betroffenen chromosomalen Region im Vergleich reduziert. Dadurch verringert sich auch die gemessene Intensität der analysierten Marker und das LRR ist kleiner als 0. Die BAF streut bei heterozygoten Deletionen entweder um 0 oder 1 (s. Abb. 12). Bei homozygoten Deletionen ist das LRR noch kleiner und es dürfte theoretisch kein Signal für die BAF ermittelt werden. Da jedoch die markerspezifischen Siliziumkugeln auch ohne hybridisierte DNA teilweise eingefärbt werden, entstehen Artefakte. Die BAF der

Marker in einer homozygoten Deletion verteilt sich daraus resultierend zufällig zwischen 0 und 1, ohne dabei ein erkennbares Cluster zu bilden.



**Abb. 6: GenomeStudio Darstellung von Chromosom 5 ohne Kopienzahlveränderung**

Das Chromosomenideogramm unten verdeutlicht die genomische Position auf Chromosom 5 in Beziehung zur Markerannotation im Referenzgenom. Die auf dem HumanOmni1-Quad BeadChip (Illumina) genotypisierten Marker werden durch blaue Punkte repräsentiert. Das Log-R-Ratio (LRR) ist oben aufgetragen. Das LRR streut um 0 und weist eine gleich gemessene Intensität im Vergleich zur Referenz auf. Darunter ist die B-Allel Frequenz (BAF) aufgetragen.

Die BAF streut in drei Clustern und repräsentiert um 0 den Genotyp AA, um 0,5 den Genotyp AB und um 1 den Genotyp BB.

Eine Duplikation liegt vor, wenn die Anzahl der Allele einer Probe im Vergleich erhöht ist. Das LRR steigt durch die vergleichsweise erhöhte gemessene Intensität der betroffenen Marker an und ist größer 0. Die Verteilung der BAF hängt von der Art der Duplikation ab: Ist nur eines der beiden Allele dupliziert, streut die BAF resultierend aus der theoretischen Verteilung der zu erwartenden vier Genotypen um 0 (für den Genotyp AAA), 0,33 (AAB), 0,67 (ABB) und 1 (BBB). Diese charakteristische BAF-Clusterverteilung wird in Abb. 8 veranschaulicht. Bei Multiplikationen (komplexeren Duplikationen) steigen entsprechend auch die möglichen Kombinationen der Genotypen und damit auch die zu erwarteten BAFs. Dabei ist die theoretische Zahl der BAF-Cluster um eins größer als die tatsächliche Kopienzahl.

### 3.3.1.4 Ermittlung der Abstammung in GS

Wurden auf dem gleichen SNP-Array-Typ neben dem Patienten auch die Eltern genotypisiert, konnten die erhobenen Allelinformationen hinsichtlich der Verteilung der BAF ausgewertet werden. Dafür wurde in GS eine Analyse der Vererbung (durch die Ausgabe des „Reproducibility and Heritability Reports“) durchgeführt, bei der versucht wurde, jede einzelne Markerinformation vom Patienten den entsprechenden Markern der Eltern zuzuordnen. Wenn dies für mindestens 99,9 % der Marker gelang, galt die

Elternschaft als nachgewiesen und die Trios wurden in die *de novo* CNV-Analyse eingeschlossen.

### 3.3.2 Genomweite Detektion von CNVs mittels QuantiSNP

Die im Kapitel 3.3.1 vorgestellte visuelle Inspektion und Beurteilung aller CNVs in GS war in der zu untersuchenden Patientenkohorte nicht zu leisten. Zudem wäre keine vollständige Beurteilung von kleinen CNV-Ereignissen möglich gewesen. Daher sollte die systematische CNV-Analyse Algorithmus-basiert unter Verwendung eines Computerprogrammes erfolgen.

Es sind unterschiedliche statistische Modelle zur CNV-Detektion von genomweiten SNP-Array-Daten verfügbar und beinhalten u. a. Hidden Markov Modelle (Colella et al., 2007; Wang et al., 2007), Segmentierungsalgorithmen (Hupé et al., 2004; Olshen et al., 2004), t-Tests und Standardabweichung des LRR (Fiegler et al., 2006). Die verschiedenen Algorithmen zur Detektion einer Veränderung der Kopienzahl können in Abhängigkeit der Parameteroptimierung zu signifikanten Unterschieden bei der CNV-Erkennung und damit zu Komplikationen in der nachfolgenden Interpretation führen (Alkan et al., 2011). Dellinger et al. (2010) haben sieben Programme unter Verwendung von echten Illumina-Daten sowie simulierten Illumina, Affymetrix und plattformunabhängigen Daten evaluiert. Nach Auswertung der statistischen Teststärke, der Falsch-Positiv-Rate und dem Programmverhalten im Betrieb wurden im Vergleich mit QuantiSNP die besten Ergebnisse bei der CNV-Detektion erzielt (Dellinger et al., 2010). Auch in einer zweiten Vergleichsstudie wurde QuantiSNP mit am besten beurteilt (Winchester et al., 2009).

QuantiSNP wurde speziell für Daten der Illumina-Plattform entwickelt und verwendet die BAF und das LRR, um mittels eines objektiven Bayes HMMs putative CNVs systematisch vorherzusagen (Colella et al., 2007). QuantiSNP errechnet für jeden erkannten CNV ein Wahrscheinlichkeitsmaß, den logBayes-Faktor (logB). Der logB wird durch die Anzahl der SNPs und der genomischen Größe in einem putativen CNV sowie der gesamten Abweichung der LRR von 0 und von den erwarteten BAF aller SNPs in einem putativen CNV beeinflusst. Je höher der logB ist, desto wahrscheinlicher handelt es sich um eine wahre Kopienzahlveränderung und nicht um ein technisches Artefakt. Im Umkehrschluss können kleine logB auf Falsch-Positive-Befunde hindeuten. Die Entwickler des Programmes schlagen einen logB 30 als Schwellenwert ab der Version

2.0 vor (<https://sites.google.com/site/quantisnp/howto>). Das bedeutet, dass mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit (Falsch-Positiv-Rate von  $> 1\%$ ) alle CNVs über einem  $\log B$  30 ein wirkliches CNV-Ereignis darstellen. In dieser Arbeit wurde ein niedrigerer Schwellenwert von  $\log B$  7 festgelegt. So konnte einerseits die Falsch-Negativ-Rate weiter verringert werden, aber andererseits erhöhte sich auch die Anzahl der zu verifizierenden CNVs und der falsch positiven Treffer.

### **3.3.3 Einschätzung der biologischen Relevanz von CNVs**

Es wurde für jede analysierte Person eine zu erwartende hohe Anzahl CNVs (Kapitel 1.2.1) detektiert. Entscheidend war daher eine möglichst sichere Beurteilung der Frequenz und der Funktion der betroffenen Gene. Daher wurden interne Kontrolldaten (Kapitel 3.3.3.1) und öffentlich zugängliche Datenbanken (Kapitel 3.3.3.2 - 3.3.3.5) für eine erste Selektion herangezogen.

#### **3.3.3.1 Nicht öffentlich zugängliche interne Kontrollkollektive**

Für die Analysen standen unterschiedliche Kontrollkollektive zur Verfügung. Das umfangreichste Kollektiv stellte das Heinz Nixdorf Recall (HNR) Kollektiv dar. Für das HNR-Kollektiv wurden populationsbasierte Personen aus Städten im Ruhrgebiet zur Untersuchung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen prospektiv rekrutiert (Schmermund et al., 2002). Auf dem HH550 wurden 383 HNR-Kontrollen genotypisiert und QuantiSNP-Daten erhoben. Von 792 HNR-Kontrollen wurden QuantiSNP-Daten basierend auf der Genotypisierung auf dem OMNI berechnet, wovon 531 zur Filterung mit Cartagenia herangezogen wurden.

Für Frequenzanalysen mit türkischer Ethnizität standen 187 gesunde Personen zur Verfügung.

Neben den Patientenkollektiven, die im Rahmen von CURE-Net aufgebaut werden konnten, wurden 62 Patienten von Dr. Stefanie Weber (Pädiatrische Nephrologie Universitätsklinikum Essen und Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Zudem wurden bei den NGS-Analysen in Kiel und Köln ebenfalls Daten hauseigener Exomkontrollen zur Reduktion der gefundenen Varianten verwandt.

### **3.3.3.2 Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER)**

Das Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) DECIPHER-Projekt (<http://decipher.sanger.ac.uk>) wurde im Jahr 2004 mit dem Ziel initiiert, in internationaler Zusammenarbeit Genotyp-Phänotyp-Assoziationen in Patienten mit Entwicklungsstörungen zu identifizieren und öffentlich zur Verfügung zu stellen (Firth et al., 2009). DECIPHER katalogisiert zudem frequente Kopienzahlveränderungen in der normalen Bevölkerung, um damit nach dem Ausschlussprinzip neue und potenziell pathogene Veränderungen zu identifizieren. DECIPHER ist strategisch positioniert, um für die klinische Diagnostik und genomische Forschung zukünftig neben den bereits implementierten strukturellen Variations- und Phänotyp-Daten auch Daten über Sequenzvariationen zu integrieren (Swaminathan et al., 2012).

In der Datenbank sind CNVs von 21.079 Patienten und 65 verschiedene Syndrome unter Beteiligung von 248 (genetischen) Zentren erfasst (Stand 24.12.2012). Sie stellt damit die mit Abstand größte öffentlich zugängliche CNV-Datenbank mit Phänotypbeschreibung dar. Daher bot sich DECIPHER in der vorliegenden Arbeit als ein Instrument zur weiteren Analyse von detektierten CNVs an.

### **3.3.3.3 Database of Genomic Variants (DGV)**

Auf die DGV (Iafrate et al., 2004) wurde bereits im Kapitel 1.2.1 eingegangen. Mit 292.693 CNVs, berichtet in 53 Studien (Stand: 04.01.2013), stellt die DGV die größte öffentlich zugängliche Datenbank (<http://dgvbeta.tcag.ca/dgv/app/home?ref=NCBI36/hg18>) für CNVs in gesunden Kontrollpersonen dar. In dieser Arbeit wurde die DGV eingesetzt, um detektierte CNVs in Patienten als benigne Variante/Polymorphismus zu identifizieren und auszuschließen.

### **3.3.3.4 University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser**

Der University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser (Kent et al., 2002) bietet einen öffentlichen Onlinezugang (<http://genome.ucsc.edu/>) zu einer ständig

wachsenden Datenbank genomischer Sequenzen und Annotationen für eine Vielzahl von Organismen. Der Browser ist ein integriertes Tool für die Visualisierung, den Vergleich und die Analyse sowie das Teilen öffentlich zugänglicher und benutzergenerierter genomischer Datensätze (Meyer et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde die von den Genotypisierungschips verwendete Referenz des NCBI build 36 [hg18] genutzt. Der UCSC Genome Browser wurde vor allem für die Überprüfung einer Involvierung von RefSeq-Genen mit spezifischen CNVs genutzt. Außerdem wurden die integrierten Datenbanken DGV und DECIPHER zur Analyse spezifischer Regionen hinsichtlich bereits berichteter CNVs als Ausgangsinformation für direkte Analysen in den jeweiligen Datenbanken verwendet. Es wurde ebenfalls von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, eigene Daten in der grafischen Oberfläche darzustellen, um Übersichtsabbildungen der assoziierten CNV-Regionen im Ergebnisteil zu generieren.

#### **3.3.3.5 Mouse Genome Informatics (MGI) Datenbank**

Die Mouse Genome Informatics (MGI) Datenbank ist eine umfassende Mausmetadatenbank (Finger et al., 2011; Begley et al., 2012; Eppig et al., 2012) und wird vom „Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, Maine, USA) öffentlich zugänglich (<http://www.informatics.jax.org>) bereitgestellt. Die MGI ist die wichtigste Online-Datenbank, in der Informationen über das Genom und den Stoffwechsel der Hausmaus (*Mus musculus*) gesammelt und frei verfügbar gemacht werden (Bult et al., 2013).

In dieser Arbeit wurden im Zusammenhang mit uro-rektalen Malformationen identifizierte Gene unter Verwendung der MGI-Datenbank, falls Informationen vorlagen, hinsichtlich ihrer Expression abgeglichen.

#### **3.3.4 Cartagenia Bench™ Software (Cartagenia)**

Die Cartagenia Bench™ Software (Cartagenia) ist eine Internetbrowser-basierte Datenbank, die lokal auf dem Server der Humangenetik in Bonn gespeichert ist. Die Integration verschiedener Datenbanken, wie z. B. RefSeq-Gene und hausinterner CNV-Kontrolldaten, ermöglichten eine semiautomatisierte Datenverarbeitung der erhobenen

QuantiSNP-Daten. Dafür wurden die zu filternden Daten in das System geladen und konnten auf einer benutzerfreundlichen Oberfläche weiterverarbeitet werden.

### 3.3.5 Auswertung und computerbasierte Analyse der NGS Daten

Die in Kiel, Berlin und Köln mittels NGS-Technologien erhobenen Daten wurden in den jeweiligen bioinformatischen Arbeitsgruppen ausgewertet und aufbereitet.

### 3.3.6 Prädiktionsprogramm (PS)<sup>2</sup>-v2 zur Vorhersage der Proteinstruktur

Es gibt viele unterschiedliche Prädiktionsprogramme zur Vorhersage der Proteinstruktur. Aufgrund der benutzerfreundlichen Handhabung, der schnellen Berechnung und dem guten Vergleichsergebnis gegen 71 verschiedene Server (CASP8 Experiment; <http://predictioncenter.org/casp8/index.cgi>) wurde für die Analyse der Auswirkung einer Stoppmutation auf die Proteinstruktur das Programm (PS)<sup>2</sup>-v2 (Chen et al., 2009) verwendet. Der Server findet sich unter der Adresse <http://ps2v2.life.nctu.edu.tw/index.php>.

Es musste zunächst die entsprechende Proteinsequenz für den Wildtyp (WT) und der Mutante (M) im FASTA Format eingegeben werden. Als Vorlage wurde dann manuell aus der Protein-Datenbank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) die entsprechende ID herausgesucht und eingegeben. Die berechneten Strukturen für WT und M wurden anschließend mit Jmol (v13) visualisiert und verglichen.

### 3.3.7 Prädiktionsprogramme zur Interpretation detektierter Varianten

Die detektierten Varianten aus der Sanger-Sequenzierung und der NGS-Ergebnisse wurden, wenn daraus ein möglicher Aminosäureaustausch resultiert, mit unterschiedlichen Prädiktionsprogrammen beurteilt. Die Programme stellen nur ein Hilfsmittel bei der Beurteilung einer Variante dar und liegen jeweils verschiedenen Algorithmen zu Grunde. Diese *in situ* Beurteilung lässt nicht grundsätzlich auf eine *in vivo* Auswirkung der zu beurteilenden Variante schließen. Es wurden für die Analyse der Varianten die internetbasierten Programme MutationTaster (Schwarz et al., 2010), PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010) und MutPred (Li et al., 2009) verwendet. Alle drei



Programme beurteilen die Varianten qualitativ und quantitativ. Qualitativ werden die überprüften Varianten in drei Klassen eingeteilt: benigne (Polymorphismus), möglicherweise schädlich sowie wahrscheinlich schädlich. Zudem wird, basierend auf den unterschiedlichen Algorithmen, eine quantitative Wahrscheinlichkeit zw. 0 und 1 angegeben.

### 3.4 Durchführung der Analysen

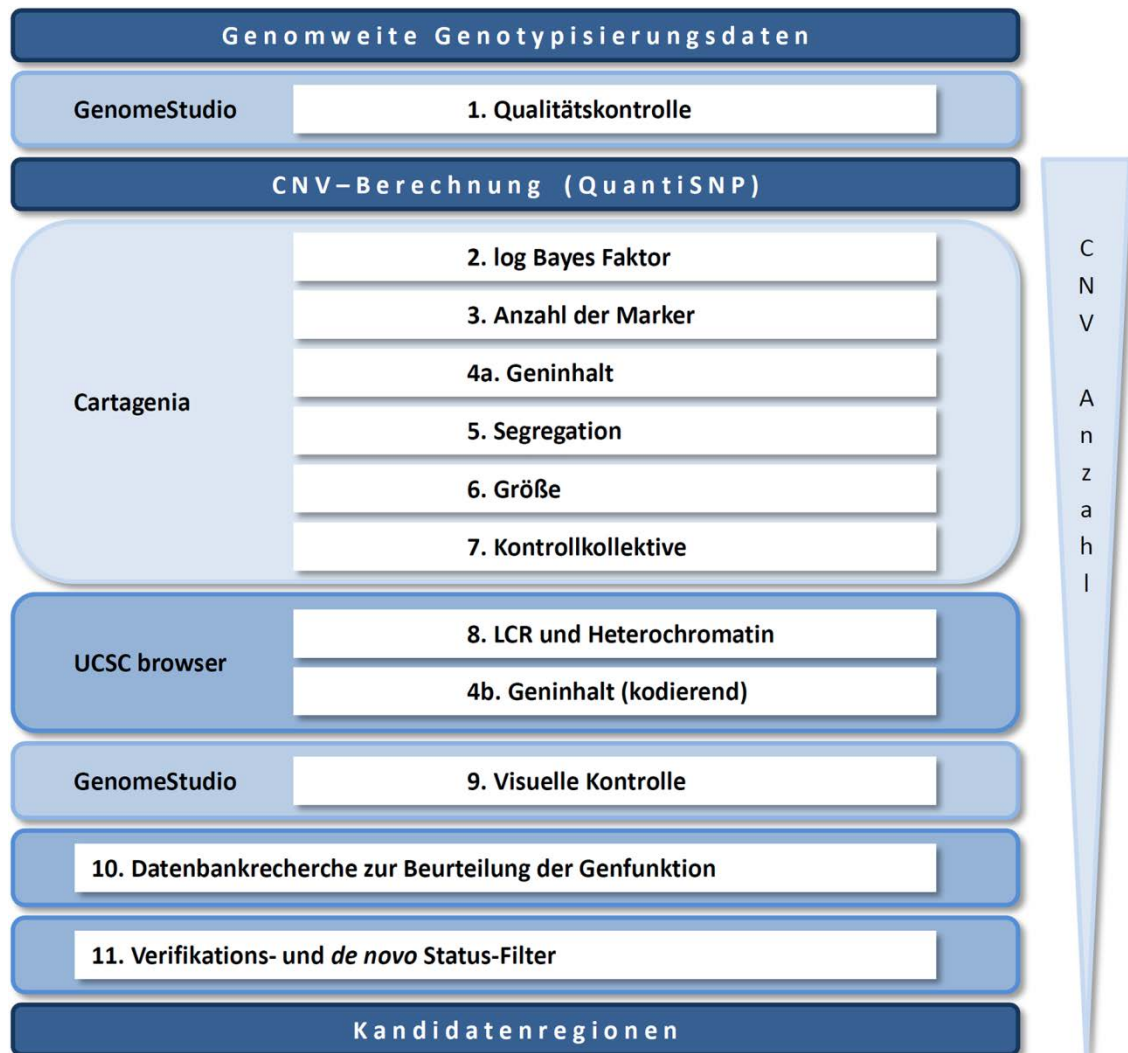
Die CNV-Analysen wurden bei ARM-Patienten für komplette Trios (Patienten mit gesunden Eltern) durchgeführt. Durch den Trio-Ansatz wurde eine genomweite *de novo* Analyse zur Eingrenzung der berechneten CNVs ermöglicht. Der Schwerpunkt wurde bei ARM auf Patienten mit VATER/VACTERL-Assoziation gelegt, da bei syndromalen ARM-Formen mehr ursächliche CNVs erwartet wurden als bei isolierten Formen. Bei dem Gros der BEEK-Patienten wurde auf eine Genotypisierung der Eltern verzichtet, da im Verlauf der Untersuchungen ein ausreichend großes Kontrollkollektiv zur Verfügung stand, mit dem benigne CNV effizient gefiltert werden konnten. Zusätzlich wurden, weltweit einzigartig, acht konsanguine Kernfamilien mit einem BEEK-Patienten im Trio-Ansatz analysiert.

Aufgrund von Vorbefunden wurden beim BEEK und PBS ausgewählte NGS-Analysen durchgeführt. Die Kopplungsbefunde einer PBS-Familie und einer KBE-Familie wurde im Vergleich zur Sangersequenzierung eine kostengünstige Exomsequenzierung durchgeführt. Acht KBE-Patienten wurden region-spezifisch mittels NGS resequenziert. Zudem wurden systematische Sanger-Sequenzierungs-Analysen parallel zu den anderen Untersuchungen an ausgewählten Kandidatengenen bei Patienten mit isoliert und syndromaler ARM und BEEK durchgeführt.

### 3.5 Filterkriterien für die CNV-Analyse

In diesem Kapitel werden die unterschiedlichen Filterkriterien und -strategien beschrieben. Kam es im Rahmen der CNV-Analyse zu Abweichungen von den allgemeinen Filterschritten, wurde dies im Ergebnisteil dokumentiert. Filterschritte waren grundsätzlich nötig, um Falsch-Positive Befunde zu reduzieren, polymorphe CNVs

zu detektieren und möglichst nur potentiell pathogene CNVs in weitere Analysen von Kandidatenregionen einzuschließen. Dafür sollten nur CNVs berücksichtigt werden, die kodierende Gensequenzen betreffen und zudem nicht vererbt wurden (*de novo*).



**Abb. 7: CNV-Filterschritte von der Genotypisierung bis zur Kandidatenregion**

Genomweite Genotypisierungsdaten wurden mittels verschiedener SNP-Array Generationen der Firma Illumina erhoben, die nach einer Qualitätskontrolle in die CNV-Berechnung durch QuantiSNP eingeflossen sind. Nach diversen Filterschritten mithilfe von Cartagenia, dem UCSC browser, GenomeStudio, weiterer Datenbanken und der anschließenden Verifikation und Überprüfung der Segregation verbleiben am Ende potentielle Kandidatenregionen. Der nach unten zusammenlaufende Pfeil an der rechten Seite verdeutlicht die abnehmende CNV-Anzahl nach jedem Filterschritt.

Einige Filterschritte erfolgten unter Verwendung von Cartagenia bzw. dem UCSC Genome Browser halbautomatisiert. Abb. 7 beschreibt die mögliche Filterung unter Berücksichtigung der aufgeführten Filterschritte.

### 1. Qualitätskontrolle der SNP-Array Daten

Ein einfaches Maß zur Erfassung der Qualität der erhobenen Genotypisierungsdaten stellt die sogenannte Call-Rate dar. Diese wurde in GS ermittelt und führte zum Ausschluss von Proben, die einen Schwellenwert von 98 % unterschritten. Dies bedeutet, mindestens 98 % der Marker auf dem verwendeten SNP-Array mussten bei jeder Probe erfolgreich genotypisiert werden, damit die jeweilige Probe in die weitere Analyse eingeschlossen wurde. Ein Teil der Filterschritte erfolgte unter Verwendung von Cartagenia oder dem UCSC Genome Browser.

## **2. log Bayes Faktor (logB)-Filter**

In Kapitel 3.3.2 wurde der logB vorgestellt. Der Ausschluss von Falsch-Positiven Ereignissen sollte vermieden werden; daher wurde als Schwellenwert ein logB 7 festgelegt (Engels et al., 2009) und mithilfe von Cartagenia gefiltert. Der daraus resultierende Einschluss von Falsch-Negativen putativen CNVs wurde dafür toleriert.

## **3. Anzahl der Marker**

QuantiSNP setzt mit dem Bayes-HMM eine Folge von Markerdaten als Voraussetzung für die Berechnung eines putativen CNVs. In dieser Arbeit wurden nur CNVs weiter berücksichtigt, die mindestens drei konsekutive Marker beinhalten. Das Herausfiltern von detektierten CNVs mit nur einem oder zwei betroffenen Markern erfolgte mittels Cartagenia.

## **4. Geninhalt**

Ziel dieser Arbeit war es u. a. CNVs zu detektieren, die Gene beinhalten. Daher wurden unter Verwendung von Cartagenia nur CNVs für weitere Analysen eingeschlossen, die intergenisch oder maximal 10.000 Bp entfernt von einem Gen detektiert wurden. Vor der visuellen Überprüfung in GS wurde zusätzlich mittels des UCSC Genome Browsers (im Filterschritt 8) feingefiltert und nur CNVs weiter berücksichtigt, die unmittelbar kodierende Gensequenzen (gelistet in RefSeqGen) betreffen.

### **5. *De novo* Filter (alternativ im Verifikationsschritt)**

Sofern eine Genotypisierung der gesunden Eltern erfolgte, wurden vererbte CNVs mittels Cartagenia ausgeschlossen. So detektierte (mögliche) *de novo* CNVs wurden mittels qPCR-Analyse erneut hinsichtlich des *de novo* Status überprüft (s. Filterschritt 11).

### **6. Längenfilter**

Eine Filterung der CNV-Daten wurde spezifisch auf die jeweilige Fragestellung angepasst. Dabei konnte im Trio-Ansatz unter Verwendung des OMNI SNP-Array sogar völlig auf eine Größenfilterung verzichtet werden.

### **7. Kontrollkollektive**

Als Kontrollkollektiv standen zunächst hausinterne CNV-Kontrolldatensätze zur Verfügung (Kapitel 3.3.3.1). Diese konnten mittels Cartagenia für den entsprechenden Filterschritt abgerufen werden. Darüber hinaus wurde die Frequenz aller bisher verbliebenen CNVs unter Verwendung des UCSC Genome Browsers in DGV (Kapitel 3.3.3.3) und DECIPHER (Kapitel 3.3.3.2) händisch überprüft und verworfen, falls diese in mindestens fünf unabhängigen Studien mit ähnlicher Auflösung in DGV oder durch mind. drei unterschiedliche Einträge in DECIPHER mit einem komplett abweichenden Phänotyp beschrieben wurden.

### **8. Ausschluss von LCR-Regionen und konstitutivem Heterochromatin**

Mittels UCSC Genome Browser wurden CNVs ausgeschlossen, die komplett in Regionen mit LCRs oder konstitutivem Heterochromatin lagen. Hier ist zum einen keine spezifische Primerbindung für die qPCR-Analyse möglich und zum anderen kann davon ausgegangen werden, dass in diesen Regionen keine kopienzahlsensitiven bzw. transkribierten Gene liegen.

### **9. GenomeStudio (GS)-Filter**

Die verbleibenden, von QuantiSNP berechneten, putativen CNVs wurden einer visuellen Kontrolle in GS unterzogen, um möglichst viele Falsch-Positiv-Befunde von der Validierungsanalyse auszuschließen.

### **10. Datenbankrecherche zur Beurteilung der Genfunktion**

Betroffene Gene wurden hinsichtlich ihrer bekannten Funktion und ihrer Expression im uro-rektalen Gewebe in öffentlich zugänglichen Datenbanken (GeneCards, KEGG, MGI,

OMIM, Pubmed, UniProt) evaluiert. Nur eindeutig nicht in Zusammenhang mit uro-  
rektalen Fehlbildungen stehende Gene wurden ausgeschlossen.

### **11. Verifikations- und *de novo* Status-Filter**

Abschließend wurde versucht, die verbleibenden putativen CNVs mittels  
Validierungsexperimenten (i. d. R. qPCR) zu bestätigen. Wenn elterliche DNA vorhanden  
war, wurde eine mögliche Vererbung (ggf. erneut; s. Filterschritt 5) überprüft.

## 4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Befunde dieser Arbeit, gegliedert nach den unterschiedlichen uro-rektalen Phänotypen, vorgestellt. Zunächst werden die Ergebnisse zum BEEK (Kapitel 4.1), anschließend zur isolierten ARM (Kapitel 4.2), dann zur VATER/VACTERL-Assoziation (Kapitel 4.3) und abschließend zum PBS (Kapitel 4.4) aufgeführt.

### 4.1 Genetische Untersuchungen bei Patienten mit Blasenekstrophie-Epispadie-Komplex (BEEK)

Die hier dargestellten Befunde zum BEEK wurden durch CNV-Analysen (Kapitel 4.1.1) sowie Sequenzierungs-Analysen (Kapitel 4.1.2) unter Verwendung von Sanger und NGS ermittelt.

#### 4.1.1 Analysen der Kopienzahlveränderungen bei BEEK

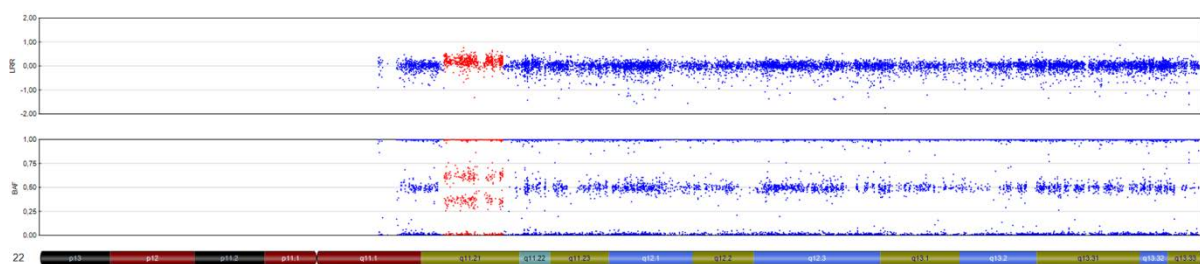
Unter Verwendung SNP-Array-basierter genomweiter Genotypisierungsdaten sowie von Daten aus MLPA und qPCR Analysen werden im folgenden Kapitel die Ergebnisse zu Duplikationen auf den Chromosomen 22 (Kapitel 4.1.1.1) und 19 (Kapitel 4.1.1.2) dargestellt. Zudem werden Ergebnisse der CNV-Analyse in acht konsanguinen iranischen Familien (Kapitel 4.1.1.3) vorgestellt.

##### 4.1.1.1 Duplikationen auf Chromosom 22

In der initialen Untersuchung wurden 16 Patienten mit isolierter BEEK ausgewählt. Es sollten CNV-Analysen durchgeführt und Erkenntnisse für Folgeuntersuchungen generiert werden. Es wurden Patienten mit einer negativen Familienanamnese ausgewählt, um ursächliche *de novo* CNVs zu identifizieren. Die Genotypisierung wurde auf dem H610Q (Illumina) entsprechend den Herstellervorgaben durchgeführt. Die BAF und der LRR für jeden genotypisierten SNP wurden anschließend verwendet, um mit QuantiSNP (v2.0) potentielle CNVs zu detektieren. Gefiltert wurde gegen die entsprechenden Schwellenwerte (s. 3.5 Filterkriterien für die CNV-Analyse):

- LogB 30 und
- Größe von 1 Mb.

Mit diesem sehr strikten Filterschritt konnte eine Mikroduplikation in einem KBE-Patient (27-501) auf Chromosom 22q11.21 identifiziert werden. Die Abb. 8 illustriert die gefundene Duplikation mit der charakteristischen BAF mit vier Clustern und einem positiven LRR, wie detailliert im Methodenteil beschrieben (Kapitel 3.3.1.3).



**Abb. 8: Mikroduplikation 22q11.21 bei Patient 27-501**

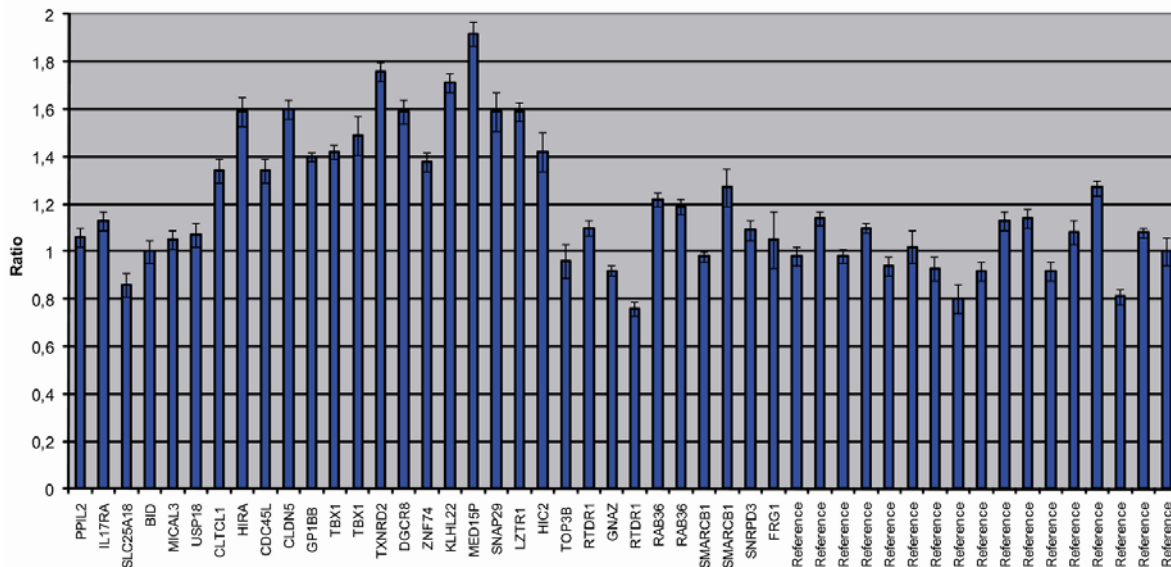
Das Chromosomenideogramm unten verdeutlicht die genomische Position auf Chromosom 22 in Beziehung zur Markerannotation im Referenzgenom unter Verwendung des Human610-Quad BeadChips von Illumina. Das Log-R-Ratio (LRR) streut deutlich über 0 und weist in Verbindung mit der Bildung von vier Clustern der B-Allel Frequenz (BAF) auf eine Duplikation in der chromosomalen Region 22q11.21 hin. Die duplizierten Marker sind rot dargestellt.

Der erste und letzte duplizierte Marker ist rs450046 bzw. rs140392. Der CNV erstreckt sich über die genomische Position chr22:17.281.004-19.792.353 und beinhaltet 510 konsekutive Marker. Die flankierenden, nicht duplizierten Marker sind rs17742907 (genomische Position 17.270.615) und rs465500 (20.128.907). Der CNV ist demnach zwischen 2,51 und 2,86 Mb groß (s. Tab. 15).

Dieser Befund konnte mittels MLPA-Analyse bestätigt werden. Dafür wurde das kommerzielle Kit P250-A1 DiGeorge (MRC-Holland) verwendet (Kapitel 3.2.5). Es konnte, wie Abb. 9 zeigt, eine 2,51 Mb-Mikroduplikation der Proben CLTCL1 bis HIC2 detektiert werden.

Die Elternschaft wurde mittels PowerPlex® bestätigt und die MLPA-Analyse der Eltern zeigte eine maternale Vererbung der beim Indexpatienten identifizierten Duplikation. Bedingt durch den Nachweis dieser maternal vererbten Mikroduplikation wurde die detaillierte Analyse der verbleibenden 15 Patienten zunächst zurückgestellt. Diese wurde nochmals, wie in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben, mit einer aktuelleren QuantiSNP

Version durchgeführt und gegen gesunde Kontrollen hinsichtlich kleinerer CNV Ereignisse (bis 30 kb) zusammen mit weiteren Patienten analysiert (Draaken et al., 2013).



**Abb. 9: MLPA-Ergebnis mit Mikroduplikation 22q11.21**

Eine Ratio von 1 impliziert eine zu erwartende Kopienzahl in der Normalbevölkerung. Werte über 1,2 deuten auf eine Duplikation und Werte unter 0,8 auf eine Deletion hin. Jeder Balken repräsentiert eine MLPA-Probe.

Duplikationen und Deletionen in der chromosomalen Region 22q11.21 sind für verschiedene Syndrome beschrieben (Shprintzen et al., 1978; Schinzel et al., 1981; Kelley et al., 1982; Ensenaer et al., 2003; Portnoï, 2009). Bis zu diesem Zeitpunkt war jedoch kein Patient mit BEEK bekannt, der eine Aberration in dieser Region zeigt. Um zu überprüfen, ob Duplikationen auf Chromosom 22q11.21 gehäuft bei BEEK-Patienten auftreten, wurde die DNA 50 weiterer Patienten mit isoliertem BEEK unter Verwendung des MLPA Kits 250-A1 untersucht.

Dabei konnte eine weitere Duplikation (von MLPA-Probe CLTCL bis LZTR1) bei einem KBE-Patienten (278-501) detektiert werden. Nach Testung der Elternschaft (PowerPlex®) konnte diese Duplikation als nicht vererbt (*de novo*) eingeordnet werden.

Zur unabhängigen Validierung und genaueren Eingrenzung der duplizierten Bereiche wurde der Patient genomweit auf dem H660W BeadChip von Illumina genotypisiert. Die *de novo* Mikroduplikation erstreckt sich über die genomische Position chr22:17.257.787-19.792.353 und beinhaltet 512 konsekutive Marker von rs2543958 bis rs140392. Der unsichere flankierende Bereich konnte durch die sicher nicht



duplizierten Marker rs2543953 von 17.022.146 bis 17.257.786. bzw. rs465500 von 19.792.354 bis 20.128.906 eingegrenzt werden. Der CNV ist demnach zwischen 2,53 Mb und 3,11 Mb groß (s. Tab. 15). In keiner der 383 analysierten Kontrollen (die auf dem HH550 von Illumina typisiert wurden) konnte eine vergleichbare Duplikation detektiert werden.

Die Ergebnisse wurden gleichzeitig mit einer schwedischen Studie veröffentlicht, die ebenfalls zwei Duplikationen in der chromosomalen Region 22q11.21 bei der Untersuchung von 35 KBE-Patienten identifizieren konnten (Draaken et al., 2010b; Lundin et al., 2010). Daraufhin wurden für eine zweite Untersuchungsreihe weitere 246 Patienten mit BEEK ausgewählt und, soweit möglich, KBE-Patienten analysiert. Auch hier wurde anfangs eine MLPA-Analyse bei allen Patienten durchgeführt. Es konnten zunächst vier weitere Patienten mit einer Duplikation in der Region auf Chromosom 22 identifiziert werden (s. Tab. 14).

**Tab. 14: Übersicht der sechs KBE-Patienten mit Mikroduplikationen auf Chromosom 22q11.12**

KBE Dup22 CNV	Patient	Geschlecht	Herkunft	Vererbung	Array
1	27-501	männlich	Mitteleuropa	maternal	H610Q
2	278-501	weiblich	Italien	de novo	H660W
3	182-501	männlich	Mitteleuropa	de novo	H660W
4	87-501	männlich	Spanien	paternal	OMNI
5	3053	männlich	USA*	de novo	H660W
6	3197	männlich	USA*	de novo	H660W

**H610Q:** Illumina Human610-Quad; **H660W:** Human660W-Quad-v1 und **OMNI:** HumanOmni1-Quad;

\*: amerikanischer Patient kaukasischer Abstammung

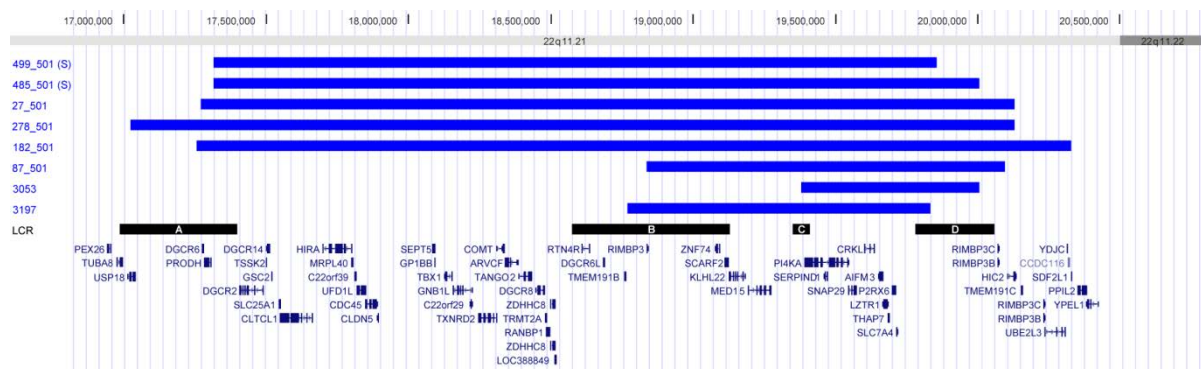
Auch bei den vier neu ermittelten Duplikationen wurde die Elternschaft überprüft (PowerPlex®); anschließend wurden die Eltern mittels MLPA-Analyse untersucht. Dabei wurde bei einem weiteren Indexpatienten (87-501) eine paternale Vererbung gefunden. Zur Validierung und Eingrenzung der Bruchpunkte wurden die vier weiteren Patienten mittels SNP-Arrays von Illumina (H660W bzw. OMNI) genotypisiert und die Daten anschließend unter Verwendung von QuantiSNP und GS ausgewertet. Tab. 15 fasst die Größen und Positionen von allen sechs identifizierten Mikroduplikationen der chromosomalen Region 22q11.21 zusammen.

**Tab. 15: Übersicht der Mikroduplikationsregion auf Chromosom 22q11.21 identifiziert mittels SNP-Array in sechs KBE-Patienten**

Patient	Anfang	Ende	maximaler Bereich	Größe in Mb
---------	--------	------	-------------------	-------------

	(Bp Position/SNP)	(Bp Position/SNP)	(inkl. flankierende Region)	(Min - Max)
27-501	17281004 rs450046	19795780 rs11703181	chr22:17.270.615-20.128.907	2,51 - 2,86
278-501	17273248 rs3810600	19791274 rs140391	chr22:17.022.145-20.128.907	2,52 - 3,11
182-501	17281004 rs450046	19935678 rs28735370	chr22:17.255.727-20.327.070	2,65 - 3,07
87-501	19118969 rs2108746	19793730 rs2845421	chr22:18.838.451-20.095.206	0,67 - 1,26
3053	19429297 rs2072513	19782237 rs1210606	chr22:19.380.613-20.005.039	0,35 - 0,62
3197	19066315 rs361764	19717967 rs5752500	chr22:18.770.863-19.833.934	0,65 - 1,06

Abb. 10 stellt die maximalen Größen und Positionen der sechs gefundenen Mikroduplikationen 22q11.21 sowie die davon insgesamt betroffenen 46 RefSeq-Gene dar. Die mehrfache Identifikation einer Duplikation 22q11.21 assoziiert diese Region mit dem Auftreten von KBE und war Anlass weiterer Untersuchungen. Die Ergebnisse der NGS-Analyse (Kapitel 4.1.2.1) sowie der Kandidatensequenzierung (Kapitel 4.1.2.5) werden entsprechend später vorgestellt.



**Abb. 10: Übersicht der Mikroduplikationen 22q11.21 nach Array-Analyse und der involvierten Gene**  
Dargestellt sind mittels UCSC Genome Browsers (hg18) die maximal betroffenen Regionen (blaue Balken) der sechs gefundenen Mikroduplikationen sowie die zwei Patienten (S) von Lundin et al. (2010). Darüber ist die genomische Position und die betroffenen Chromosomenbanden aufgetragen. LCR (low copy repeat)-Regionen A bis D sind schwarz dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind die RefSeq-Gene in der Region aufgetragen, von denen 46 in der maximal duplizierten Region liegen.

#### 4.1.1.2 Duplikation auf Chromosom 19

Initial wurde eine CNV-Analyse bei 16 BEEK-Patienten und deren gesunden Eltern durchgeführt (Kapitel 4.1.1.1 und 5.1.1). Resultierend auf diesen Befunden wurden für eine zweite CNV-Analyse in einer größeren Kohorte insgesamt 110 mitteleuropäische

BEEK-Patienten mit unauffälliger Familienanamnese ausgewählt. Der Schwerpunkt lag hierbei auf Patienten mit KBE ( $n = 95$ ). Zudem wurden acht Patienten mit E und sieben mit KE analysiert. Für anschließende Analysen standen von 91 Patienten beide Eltern zur Verfügung. Bei 15 Patienten war lediglich DNA von einem Elternteil vorhanden und bei 4 Patienten lag keine elterliche DNA vor.

Nach Herstellerangaben wurden 33 Patienten auf dem H610Q, 12 Patienten auf dem H660W bzw. 65 auf dem OMNI BeadChip von Illumina genotypisiert. Die mittels QuantiSNP prognostizierten 22.586 CNV-Befunde wurden wie folgt gefiltert (Kapitel 3.5):

- Schwellenwerte: 30 Kb; logB 7; mindestens drei betroffene Marker,
- maximal dreimaliges Vorkommen im Kontrollkollektiv,
- Involvierung kodierender Sequenzen (Geninhalt),
- maximal dreimaliges Vorkommen in öffentlich zugänglichen CNV-Datenbanken und
- visuelle Kontrolle und Beurteilung in GS.

Nach diesen konservativen Filterkriterien verblieben 14 heterozygote CNVs (acht Deletionen und sechs Duplikationen) bei insgesamt neun verschiedenen Patienten (s. Tab. 16). Da zu jedem der neun Patienten elterliche DNA beider Eltern zur Verfügung stand, wurde zunächst für jeden der neun Patienten die Elternschaft mittels PowerPlex® überprüft. Anschließend wurden die detektierten 14 CNVs mittels qPCR verifiziert und unter Einbezug der Eltern eine familiäre Segregation der jeweiligen Variante überprüft (verwendete Oligonukleotide für jede Region sind im Anhang B aufgelistet).

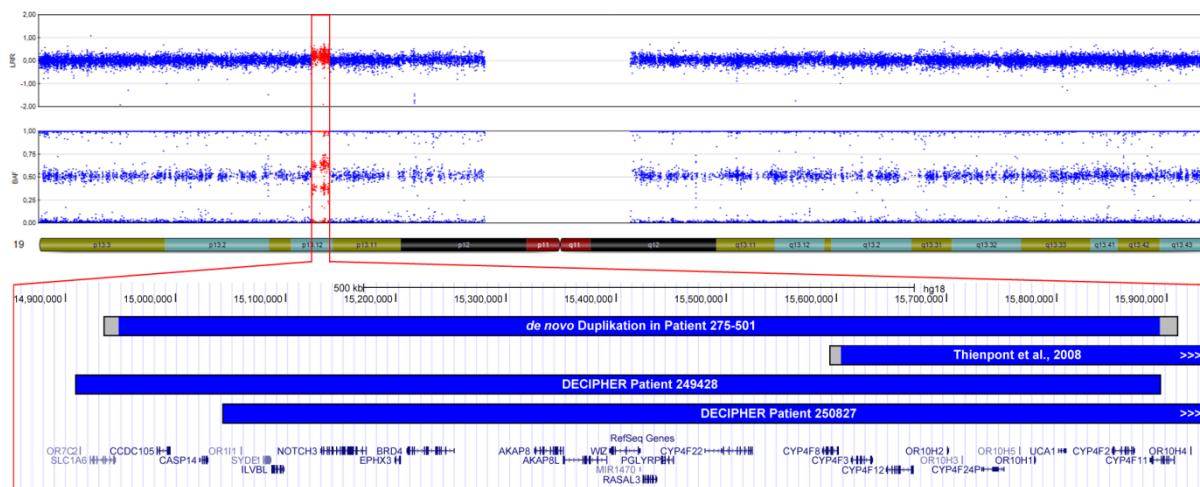
**Tab. 16: qPCR Ergebnisse der gefilterten CNV-Befunde in 110 BEEK-Patienten**

Patient	genomische Position [hg18]	Größe [Kb]	betroffene Marker	log Bayes Faktor	Aberration	qPCR-Ergebnis
19_501	chr7:6.557.534-6.656.765	99,2	31	38,68	Duplikation	pat
19_501	chr7:7.104.992-7.376.916	271,9	156	291,07	Duplikation	pat
21_501	chr10:34.423.178-34.622.540	199,4	90	317,60	Deletion	pat
28_501	chr4:129.993.331-130.147.254	153,9	39	123,15	Duplikation	mat & pat
78_501	chr1:103.225.785-103.321.085	95,3	23	35,44	Deletion	f. p.
78_501	chr3:166.197.226-166.260.487	63,3	12	10,76	Deletion	f. p.
78_501	chr4:64.825.305-64.877.457	52,2	12	31,49	Deletion	f. p.
78_501	chr7:134.371.537-13.4423.024	51,5	29	15,22	Deletion	f. p.
245_501	chr10:96.393.482-96.511.062	117,6	252	789,68	Deletion	mat
273_501	chr19:531.164-589.853	58,7	44	38,02	Duplikation	mat

275_501	chr1:204.488.435-204.583.881	95,4	13	13,76	Deletion	mat
<b>275_501</b>	<b>chr19:14.944.640-15.888.067</b>	943,4	<b>697</b>	<b>*</b>	<b>Duplikation</b>	<b>de novo</b>
553_501	chr22:32.288.689-32.428.417	139,7	62	85,58	Deletion	mat
556_501	chr6:44.889.986-45.230.225	340,2	86	198,95	Duplikation	mat

\*: Fünf einzelne QuantiSNP Ergebnisse; f. p.: falsch positiv; mat: maternal vererbt; pat: paternal vererbt

Die Ergebnisse der qPCRs sind in Tab. 16 dargestellt und alle gefundenen Aberrationen unter Angabe der Größe (in Kb) geordnet nach Patienten aufgelistet. Zudem sind in Tab. 16 für alle gefundenen Aberrationen die genomischen Start- und Endpositionen auf den betreffenden Chromosomen aufgelistet. Die Anzahl der betroffenen Marker sowie die von QuantiSNP ermittelten logB sind, wie auch die jeweiligen qPCR Ergebnisse, angegeben. Mithilfe der qPCR-Ergebnisse konnte eine 0,94 Mb *de novo* Mikroduplikation bei Patient 275\_501 (in Tab. 16 fett markiert) validiert werden. Dieser *de novo* CNV betrifft die chromosomale Region 19p13.12 (s. Abb. 11). Der Patient wurde auf dem OMNI-Array genotypisiert.



**Abb. 11: Mikroduplikation 19p13.12 nach Draaken et al. (2013)**

Das Chromosomenideogramm in der Mitte verdeutlicht die genomische Position auf Chromosom 19 in Beziehung zur Markerannotation im Referenzgenom. Verwendet wurde für die Genotypisierung der HumanOmni1-Quad BeadChip von Illumina. Das Log-R-Ratio (LRR) streut im rot markierten Bereich deutlich über 0 und weist in Verbindung mit der Bildung von vier Clustern der B-Allel Frequenz (BAF) auf eine Duplikation in der chromosomalen Region 19q13.12 hin. Im unteren Teil ist die betroffene Region im UCSC Genome Browser (hg18) dargestellt. Illustriert sind neben dem vorgestellten Patienten (275-501) die maximal duplizierte Regionen von zwei DECIPHER-Patienten und einem Vorbefund aus der Literatur (**Thienpont et al., 2008**) sowie die RefSeq-Gene.

Die Abb. 11 zeigt oberhalb der Darstellung von Chromosom 19 die visualisierten GS-Daten von Patient 275-501. Für jeden Marker ist unter dem jeweiligen LRR die BAF aufgetragen. Charakteristisch für Duplikationen ist das LRR im Bereich der detektierten Mikroduplikation erhöht (>0) und gleichzeitig bilden die BAF vier Cluster. Unterhalb des

Chromosomen-Idiogramms ist der detektierte CNV in Relation zu den Einträgen in DECIPHER (Patienten 249428 und 250827), Vorbefunden aus der Literatur (Thienpont et al., 2008) sowie den in RefSeq gelisteten Genen abgebildet.

Die Mikroduplikation betrifft 697 konsekutive Marker (Marker SNP19-14944640 bis rs6512075) auf dem Array und umfasst den genomischen Chromosomenbereich nach hg18 von 14944640 bp bis 15888067 bp. Die flankierenden, sicher nicht duplizierten Marker (rs1401807 und rs12973181) engen den Bereich der Bruchpunkte auf 12,63 Kp bzw. 15,19 Kb ein, so dass die Mikroduplikation maximal 0,97 Mb groß ist. In der duplizierten Region liegen 20 validierte RefSeq-Gene sowie zwei ncRNAs, die in Tab. 17 aufgelistet sind. Die Art bzw. Orientierung der Duplikation konnte mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)-Analyse nicht ermittelt werden, da kein entsprechendes Material des Patienten zur Verfügung stand.

Tab. 17: RefSeq-Gene in der Duplikationsregion auf Chromosom 19p13.12

Gen	Name	genomische Position	Strang	Exon-anzahl	Gen
<i>SLC1A6</i>	NM_005071	chr19:14.921.990-14.944.730	-	9	kodierend
<i>CCDC105</i>	NM_173482	chr19:14.982.538-14.995.083	+	7	kodierend
<i>CASP14</i>	NM_012114	chr19:15.021.290-15.030.103	+	7	kodierend
<i>ILVBL</i>	NM_006844	chr19:15.086.784-15.097.577	-	16	kodierend
<i>NOTCH3</i>	NM_000435	chr19:15.131.443-15.172.792	-	33	kodierend
<i>EPHX3</i>	NM_001142886	chr19:15.198.732-15.204.858	-	8	kodierend
<i>BRD4</i>	NM_058243	chr19:15.209.300-15.252.262	-	20	kodierend
<i>AKAP8</i>	NM_005858	chr19:15.325.331-15.351.612	-	14	kodierend
<i>AKAP8L</i>	NM_014371	chr19:15.351.858-15.390.833	-	14	kodierend
<i>WIZ</i>	NM_021241	chr19:15.393.317-15.421.762	-	8	kodierend
<i>RASAL3</i>	NM_022904	chr19:15.423.437-15.436.382	-	18	kodierend
<i>PGLYRP2</i>	NM_052890	chr19:15.440.456-15.451.315	-	5	kodierend
<i>CYP4F22</i>	NM_173483	chr19:15.480.335-15.524.128	+	14	kodierend
<i>CYP4F8</i>	NM_007253	chr19:15.587.028-15.601.447	+	13	kodierend
<i>CYP4F3</i>	NM_000896	chr19:15.612.706-15.632.570	+	13	kodierend
<i>CYP4F12</i>	NM_023944	chr19:15.644.827-15.668.984	+	13	kodierend
<i>OR10H2</i>	NM_013939	chr19:15.699.833-15.700.862	+	1	kodierend
<i>CYP4F24P</i>	NR_033864	chr19:15.731.143-15.751.798	-	10	mRNA
<i>OR10H1</i>	NM_013940	chr19:15.778.816-15.779.936	-	1	kodierend
<i>UCA1</i>	NR_015379	chr19:15.800.756-15.808.131	+	3	mRNA
<i>CYP4F2</i>	NM_001082	chr19:15.849.833-15.869.884	-	13	kodierend
<i>CYP4F11</i>	NM_021187	chr19:15.884.179-15.906.676	-	12	kodierend

Zudem konnten bei diesem Patienten (275-501) zwei weitere CNVs detektiert werden. Diese wurden mittels qPCR (verwendete Oligonukleotide s. Anhang B) validiert und als maternal vererbt klassifiziert. Hierbei handelt es sich um eine 95,5 Kb große Mikrodeletion auf Chromosomenabschnitt 1q32.1 (s. Tab. 16) sowie um eine 1 Mb-Mikroduplikation auf 17q25.1, die aufgrund ihrer Frequenz in Kontrollen zunächst herausgefiltert wurde.

Aufgrund des Ergebnisses ist anzunehmen, dass in der identifizierten Mikroduplikation auf Chromosom 19p13.12 ein für den BEEK pathogenes Gen kartiert (Draaken et al., 2013). Deswegen wurde eine weitere Aufarbeitung des Befundes angeschlossen (Kapitel 4.1.2.4).

#### 4.1.1.3 CNV-Analyse in acht konsanguinen iranischen Familien

Auf dem OMNI BeadChip von Illumina wurden separat von den anderen Analysen acht konsanguine Patienten mit KBE aus dem Iran nach Herstellervorgaben genotypisiert.

Die mittels QuantiSNP prognostizierten 3.726 CNV Befunde wurden wie folgt gefiltert (s. 3.5):

- Filter 1 (Cartagenia) mit den Schwellenwerten: logB 7, mindestens drei betroffene Marker, max. dreimaliges Vorkommen im Kontrollkollektiv, Involvierung kodierender Sequenzen (Geninhalt),
- Filter 2 (händisches Nachfiltern und 10 Kb CNV-Mindestgröße),
- Filter 3 (UCSC/GS): Vorkommen in öffentlich zugänglichen CNV-Datenbanken, visuelle Kontrolle und Beurteilung.

Die Reduzierung der detektierten CNVs in den acht Patienten stellt Tab. 18 dar.

**Tab. 18: Detektierte CNVs und Filterschritte in acht konsanguinen iranischen KBE-Patienten**

Patienten	Geschlecht	QuantiSNP	Filter 1	Filter 2	Filter 3
757-501	männlich	332	48	5	1
758-501	männlich	346	64	8	0
761-501	männlich	366	57	12	0
762-501	männlich	357	80	11	1
763-501	männlich	344	72	8	0
765-501	männlich	347	60	5	0
768-501	männlich	359	74	14	0
771-501	weiblich	375	68	8	2
<b>Summe</b>		<b>2.826</b>	<b>523</b>	<b>71</b>	<b>4</b>

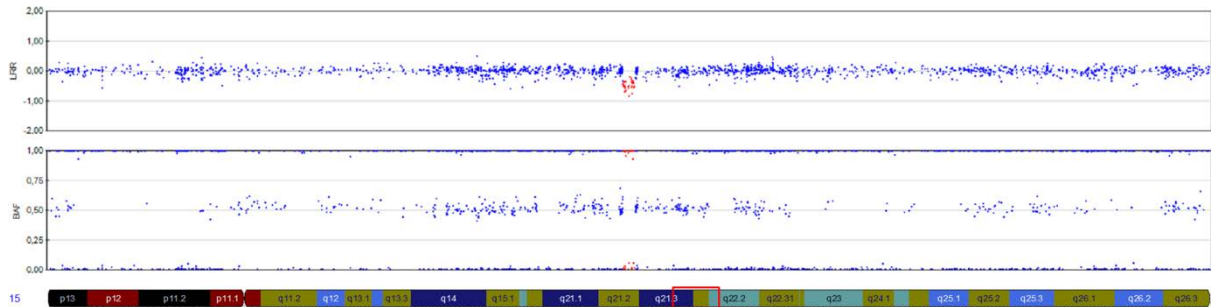
Die resultierenden vier CNVs in drei Patienten (s. Tab. 19) beinhalten die Gene *GLIPR1* (*GLI pathogenesis-related 1*), *KRR1* (*small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)*), *MXRA5* (*matrix-remodelling associated 5*), *TEK* (*tyrosine kinase, endothelial*), *C9orf11* (*EQTN; equatorin, sperm acrosome associated*) und *ALDH1A2* (retinaldehyde dehydrogenase 2).

**Tab. 19: Übersicht der vier verbleibenden CNVs in acht konsanguinen iranischen Patienten**

Patient	genomische Position	Größe [Kb]	betroffene Marker	log Bayes-Faktor	Aberration	Gen
757-501	chr12:74.130.571-74.180.381	49,8	21	61,8	Deletion	<i>GLIPR1/KRR1</i>
762-501	chrX:3.251.791-3.275.143	23,4	6	14,0	Duplikation	<i>MXRA5</i>
771-501	chr9:27.189.373-27.282.279	92,9	79	86,5	Duplikation	<i>TEK/C9orf11</i>
<b>771-501</b>	<b>chr15:56.043.964-5.6082.908</b>	<b>38,9</b>	<b>31</b>	<b>148,7</b>	<b>Deletion</b>	<b><i>ALDH1A2</i></b>

Nach Beurteilung der Genfunktion verblieb für die weiterführende Analyse die Mikrodeletion auf 15q22.1, detektiert in Patient 771-501 (s. Abb. 12). Der CNV beinhaltet 31 kohärente Marker (erster deletierter Marker rs2414527; letzter

deletierter Marker rs4646600) und wurde von QuantiSNP mit dem signifikanten logB 148,7 detektiert.



**Abb. 12: Mikrodeletion 15q22.1**

Das Chromosomenideogramm unten verdeutlicht die genomische Position der Marker auf Chromosom 15 in Beziehung zur Markerannotation im Referenzgenom unter Verwendung des HumanOmni1-Quad BeadChip von Illumina. Das Log-R-Ratio (LRR) streut deutlich unter 0 und weist in Verbindung mit dem Fehlen des heterozygoten Clusters um 0,5 der B-Allel Frequenz (BAF) auf eine heterozygote Deletion in der chromosomalen Region 15q22.1 hin. Die deletierten Marker sind rot dargestellt.

Zur Verifikation und Bestimmung des *de novo* Status wurde eine qPCR (Oligonukleotide s. Anhang C) durchgeführt, nachdem die Elternschaft mittels PowerPlex® nachgewiesen werden konnte. Diese Untersuchung zeigte eine paternale Vererbung der Mikrodeletion.

Abschließend wurde das betroffene Gen *ALDH1A2* beim Patienten nach Sanger sequenziert. Die verwendeten Oligonukleotide sowie Amplifikations- und Sequenzierungsbedingungen sind im Anhang E aufgelistet. Dabei konnte in keinem der kodierenden 13 Exons samt Spleißstellen eine Mutation detektiert werden.

#### 4.1.2 Sequenzierungsanalysen

Die Ergebnisse der NGS-Analysen zur Duplikation auf Chromosom 22 (Kapitel 4.1.2.1) und die Analysen mittels NGS in einer konsanguinen marokkanischen Familie (Kapitel 4.1.2.2) bilden den Anfang in diesem Kapitel. Daran schließen sich Resultate aus den Kandidatengenanalysen *CYR61* (Kapitel 4.1.2.3), *WIZ* (Kapitel 4.1.2.4) sowie *SNP29* und *CRKL* (Kapitel 4.1.2.5) an.



#### 4.1.2.1 NGS Analysen bei Duplikationen auf Chromosom 22

Nach paralleler Veröffentlichung von zwei KBE-Patienten mit Mikroduplikation 22q11.21 (Draaken et al., 2010b) und zwei weiteren KBE-Patienten mit Hörbeeinträchtigung (Lundin et al., 2010) wurden zusätzliche Patienten analysiert und vier weitere KBE-Patienten mit einer Mikroduplikation auf 22q11.21 detektiert (Kapitel 4.1.1.1). Die Bruchpunkte liegen bei allen acht Patienten im Bereich von LCRs (low-copy repeats), auch segmentalen Duplikationen genannt, die in der betreffenden Region alphabetisch mit A bis D kodiert sind (Babcock et al., 2003). Die Bruchpunkte bei fünf dieser Patienten liegen jeweils in den LCRs A bis D. Zwei CNVs erstrecken sich von LCR B bis D und in der kleinsten duplizierten Region sind die LCRs C bis D involviert (s. Abb. 14).

Um die Bruchpunkte weiter eingrenzen und potentielle zusätzliche Mutationen in den involvierten 46 Genen detektieren zu können, wurden alle acht KBE-Patienten in Kooperation mit dem MPI in Berlin mittels NGS in der Duplikationsregion fokussiert resequenziert. Zur Anreicherung der maximal duplizierten Region über die flankierenden LCRs A und D hinaus wurde ein NimbleGen Sequence Capture Array entworfen, der die genomische Region chr22:16.749.999-20.465.000 abdeckt (s. Abb. 14). Die Patienten-DNAs wurden dafür und für die anschließende Sequenzierung auf dem Roche GS-FLX-Titanium (jeweils zwei Proben pro Pikotiterplatte) nach Herstellervorgaben prozessiert.

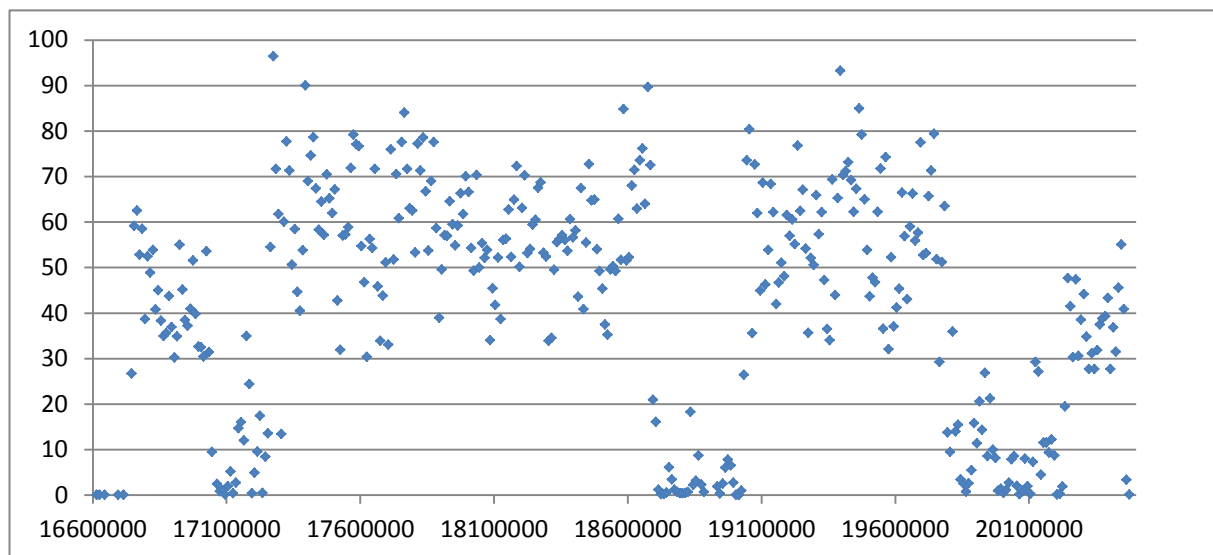
Die anschließende bioinformatische Aufbereitung der Daten erfolgte ebenfalls am MPI in Berlin. Die erhaltenen Sequenzen wurden unter der Verwendung des Programms Newbler (v2.6 von Roche) gegen hg18 abgeglichen und das pathogene Potential unter Verwendung der Vorhersageprogramme PolyPhen-2 und MutationTaster analysiert.

Es wurden 113 unterschiedliche Varianten in kodierenden Genabschnitten und möglichen Spleißstellen detektiert. Davon sind 33 Varianten homozygot, die aber alle in dbSNP mit einer Frequenz von mind. 12 % gelistet sind. Laut PolyPhen-2 und MutationTaster könnten drei Varianten krankheitsauslösend sein (s. Tab. 20). Die Varianten in *PRODH* (proline dehydrogenase [oxidase] 1) und in *C22orf25* (chromosome 22 open reading frame 25) wurden aufgrund ihrer Funktion (s. Kapitel 5.1.1) nicht weiter verfolgt.

**Tab. 20: Heterozygote Varianten mit pathogenem Potential nach PolyPhen-2 und MutationTaster in der Mikroduplikationsregion auf Chromosom 22q11.21**

Patient	Gen	Position [bp]	Allel 1	Allel 2	dbSNP
27-501	<i>PRODH</i>	17.285.899	G	A	rs3970559
27-501 und 499_501 (S)	<i>PRODH</i>	17.285.964	C	T	rs2904552
27-501	<i>C22orf25</i>	18.423.504	G	A	

Die Abdeckung der angereicherten Region durch abgegliche Sequenzen konnte die Bruchpunkte der CNVs im Vergleich zu den SNP-Array-Daten näher eingrenzen und validierte nochmals die einzelnen Mikroduplikationen auf 22q11.21. Abb. 13 illustriert exemplarisch für Patient 27-501 die durchschnittliche Abdeckung pro 10 Kb.



**Abb. 13: Abdeckung der abgeglichenen NGS-Sequenzen von Patient 27-501 auf Chromosom 22**

Die Abdeckung der abgeglichenen NGS-Sequenzen ist in Abhängigkeit zur genomischen Position pro 10 Kb aufgetragen. Am Anfang und Ende ist der nicht duplizierte Bereich mit einer Abdeckung von 30-60 X dargestellt. Die duplizierten Bereiche haben eine verhältnismäßig erhöhte Abdeckung. Innerhalb der LCR Regionen konnten die Sequenzen größtenteils nicht zugeordnet werden, daher ist dort die Abdeckung gegen 0 X.

Mithilfe der Analyse der Sequenzabdeckung der angereicherten Region konnten die Bruchpunkte der CNVs bei jedem Patienten, wie in Tab. 21 aufgelistet, eingegrenzt werden.

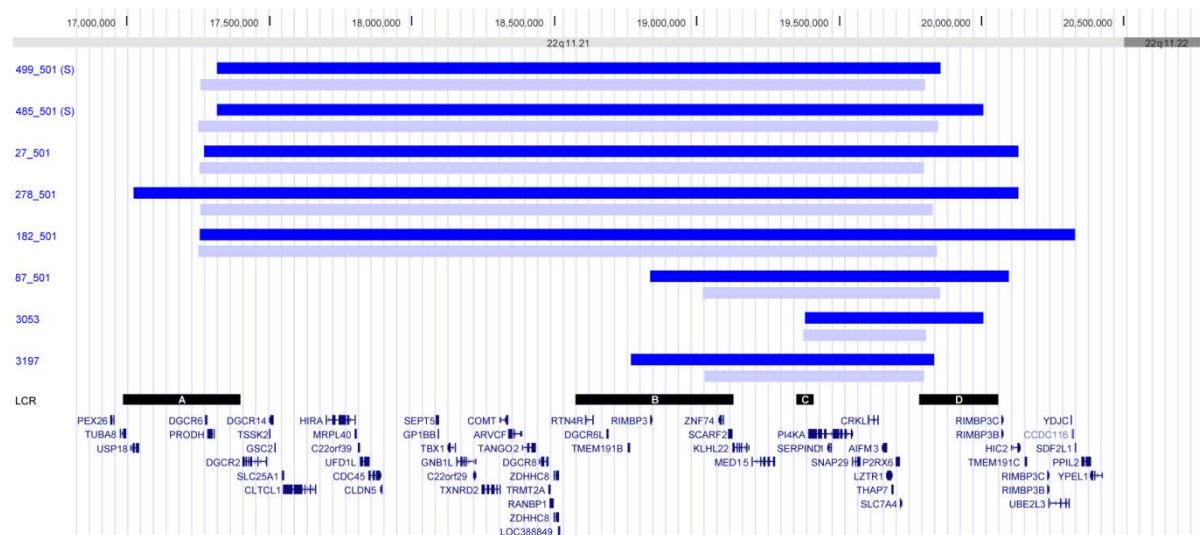
**Tab. 21: Übersicht der Mikroduplikationsregionen auf Chromosom 22 (22q11.21) detektiert mittels NGS in acht KBE-Patienten**

Patient	Anfang (bp Position)	Ende (bp Position)	maximaler Bereich (inkl. flankierende Region)	Größe [Mb]
27_501	17.264.371	19.784.371	chr22:17.254.371-19.794.371	2,52-2,54
278_501	17.267.592	19.817.592	chr22:17.257.592-19.827.592	2,55-2,57
182_501	17.272.585	19.792.585	chr22:17.252.585-19.842.585	2,52-2,59

Patient	Anfang (bp Position)	Ende (bp Position)	maximaler Bereich (inkl. flankierende Region)	Größe [Mb]
87_501	19.042.104	19.792.104	chr22:19.022.104-19.852.104	0,75-0,83
3053	19.382.364	19.782.364	chr22:19.372.364-19.802.364	0,4-0,43
3197	19.046.180	19.736.180	chr22:19.026.180-19.796.180	0,69-0,77
499_501 (S)	17.270.040	19.750.040	chr22:17.260.040-19.800.040	2,48-2,54
485_501 (S)	17.263.402	19.783.402	chr22:17.253.402-19.843.402	2,52-2,59

S: schwedischer Patient aus der Studie von Lundin et al. (2010); **Anfang** und **Ende**: sicher duplizierter Bereich; **maximaler Bereich**: sicher duplizierter Bereich erweitert um den nicht eindeutigen Bereich mit nicht eindeutiger Kopienzahl

In Abb. 14 werden die maximal duplizierten Regionen nach Auswertung der SNP-Array- und NGS-Daten für jeden Patienten gegenübergestellt.



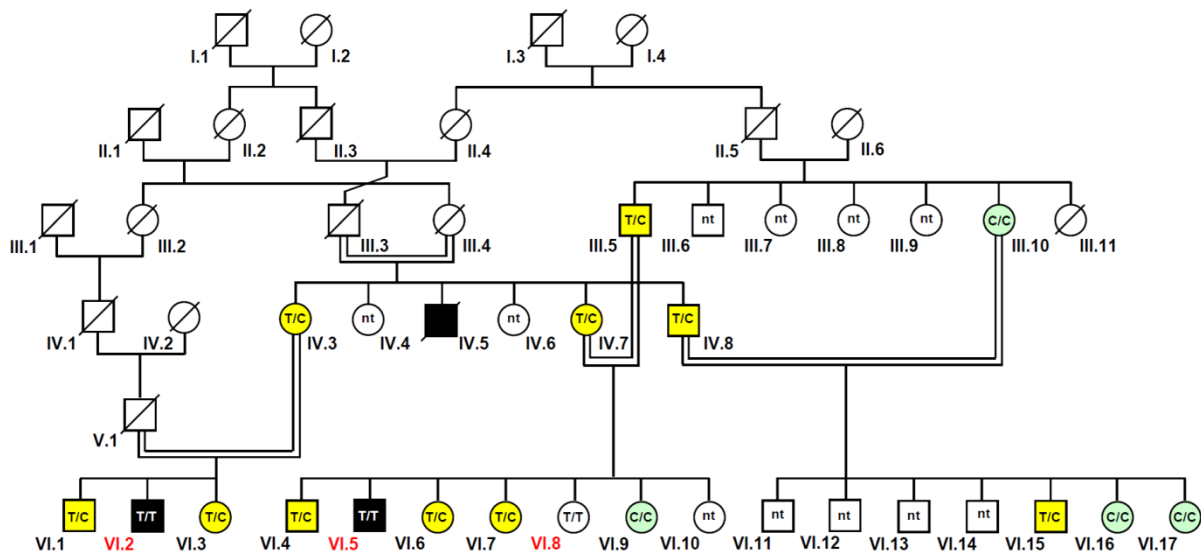
**Abb. 14: Acht Mikroduplikationen 22q11.21 nach NGS- und Array-Analyse**

Vergleichend mittels UCSC Genome Browser (hg18) sind die maximal betroffenen CNV-Regionen der acht Patienten aufgetragen. In hellblau dargestellt die NGS- und in dunkelblau die Array- Daten für jeden Patienten. Darüber ist die genomische Position und die betroffenen Chromosomenbanden aufgetragen. LCR (low copy repeat)-Regionen A bis D sind schwarz dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind die RefSeq-Gene in der Region aufgelistet, von denen 46 in der maximal duplizierten Region liegen.

Für eine weitere Kandidatenanalyse wurde der Fokus auf die kleinste in allen acht KBE-Patienten duplizierte Region gelegt. Durch die Kombination der SNP-Array- sowie NGS-Daten wurde die genomische Region chr22:19.380.613-19.794.371 mit einer Größe von 0,41 Mb identifiziert. Die Ergebnisse der Analyse werden in Kapitel 4.1.2.5 vorgestellt.

#### 4.1.2.2 NGS Analyse einer konsanguinen marokkanischen Familie

Bei einer konsanguinen marokkanischen Familie (s. Abb. 15) wurde im Vorfeld eine parametrische Kopplungsanalyse mit autosomal-rezessivem Erbgang zusammen mit dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin durchgeführt. Dabei ergab sich ein Kopplungsbefund mit einem LOD-Score von 3,6 in der chromosomalen Region 3q26.1-p24.3 (chr3:7.473.258-19.736.205). In der 12,26 Mb großen Region kartieren 84 RefSeq-Gene. Zur Eingrenzung der in Frage kommenden Varianten/Kandidatengene wurde ein exomweiter Sequenzierungsansatz gewählt, bei dem gezielt die Gene der oben genannten Kopplungsregion auf das Vorliegen homozygoter Varianten bei zwei Familienmitgliedern mit KBE (VI.2 und VI.5) analysiert wurden.



**Abb. 15: Stammbaum der konsanguinen marokkanischen Familie**

I-VI: Generation; **Kreis**: weiblich; **Kasten**: männlich; **Querbalken**: verstorben; **gefüllte Fläche**: betroffene Familienmitglieder; **nt**: nicht getestet, da keine DNA zur Verfügung stand; **C/C**, **T/C** und **T/T**: Genotyp für rs3208837.

Am Institut für Klinische Molekularbiologie in Kiel wurden die kodierenden genomischen Bereiche beider Patienten mit dem Agilent SureSelect Human All Exon 38 Mb-Kit angereichert und anschließend auf dem Applied Biosystems SOLiD™ 4 (Life Technology) sequenziert. Die gewonnenen Sequenzen wurden ebenfalls in Kiel gefiltert und unter einem Modell mit verminderter Penetranz bioinformatisch aufbereitet.

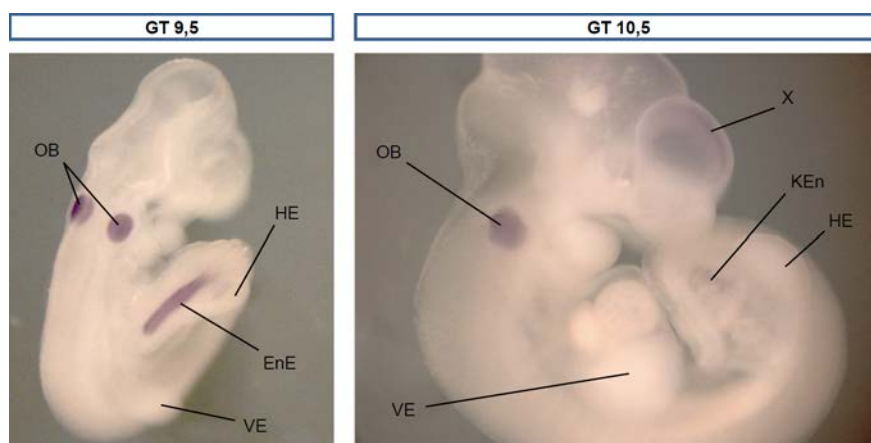
Bei Patient 70-501 wurden 31.973 bzw. 31.988 Varianten bei Patient 70-502 detektiert. Davon kartieren 59 (VI.2) und 54 (VI.5) Varianten in der Kopplungsregion auf Chromosom 3. Beiden Patienten sind 14 dieser Varianten gemeinsam (s. Tab. 22).

**Tab. 22: Gemeinsame Varianten in der Kopplungsregion auf Chromosom 3 bei zwei konsanguinen marokkanischen KBE-Patienten**

Position	refBase	varBase	mutTyp	Gen	Kategorie	Effekt	SNP Name	g1000CEU
9.758.147	A	G	Hom	<i>BRPF1</i>	Intron	-	rs696513	0,49
9.778.126	A	G	Hom	<i>OGG1</i>	Intron	-	rs17252807	0,63
9.842.625	C	T	Hom	<i>TTLL3</i>	Exon	Syn	rs3732527	0,73
9.845.857	G	A	Hom	<i>TTLL3</i>	Exon	Syn	rs2290303	0,60
9.846.030	T	G	Hom	<i>TTLL3</i>	Exon	Mis	rs2290305	0,74
<b>9.849.914</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>Hom</b>	<b><i>TTLL3</i></b>	<b>Exon</b>	<b>Non</b>	<b>rs3208837</b>	<b>0,05</b>
9.945.031	A	G	Hom	<i>IL17RC</i>	Exon	Mis	rs279549	1,00
9.951.159	A	G	Hom	<i>CRELD1</i>	Exon	mis	rs279552	1,00
9.966.388	G	C	Hom	<i>PRRT3</i>	Exon	mis	rs279601	0,99
10.010.896	A	T	Het				rs7615088	0,14
10.081.532	C	T	Het	<i>FANCD2</i>	Exon	mis	rs3864017	0,15
10.216.987	A	C	Hom	<i>IRAK2</i>	Intron	-	rs263410	0,85
11.275.707	T	C	Hom	<i>HRH1</i>	5'-UTR	-		0,83
11.618.465	T	C	Hom	<i>VGLL4</i>	Exon	mis	rs2276749	0,97

**RefBase:** Base im Referenzgenom; **varBase:** bei den Patienten detektierte Base; **mutTyp:** Art des Austausches; **hom:** homozygot; **het:** heterozygot; **syn:** synonym; **mis:** missense; **non:** nonsense; **g1000CEU:** Frequenzangaben im 1000-Genome-Projekt.

Nach Beurteilung der Varianten wurde der homozygote Basenaustausch von C nach T an genomischer Position 9849914 auf Chromosom 3 (rs3208837) in *TTLL3* (tubulin tyrosine ligase-like family, member 3) als potentielle pathogene Variante aufgrund der geringen MAF im 1000-Genome-Projekt und der spezifischen Expression in der kloakalen Region (s. Abb. 16) selektiert.



**Abb. 16: WISH- Expressionsanalyse von *Tll3***

*Tll3* ist im Mausembryo spezifisch am Gestationstag (GT) 9,5 und GT 10,5 in der Kloaken- und Darmregion exprimiert. Expressionsmuster von *Tll3* in den Entwicklungsstadien GT 9,5 und GT 10,5 der Mausembryonen zeigt eine spezifisch Expression in der ventrokaudalen Region. Am GT 9,5 zeigt sich neben der Expression im EnE noch eine Anfärbung der OB. Am GT 10,5 zeigen sich Färbungen am UK und OK des BB, sowie im Bereich der VE und HE. Am GT 10,5 ist *Tll3* im KEn und ebenfalls im OB exprimiert. EnE: Entoderm (Enddarm), HE: Hinterextremität, KEn: (kloakales) Entoderm, OB: Ohrbläschen (Innenohrvorläufer), VE: Vorderextremität, X: unspezifische Sonden-anlagerung.

Die Variante rs3208837 konnte mittels Sanger-Sequenzierung in beiden Patienten validiert werden. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sowie die Reaktionsbedingungen der Amplifikation und Sequenzierung sind im Anhang F aufgelistet. Anschließend wurden alle weiteren verfügbaren Familienmitglieder genotypisiert (s. Tab. 23). Eine gesunde Schwester (VI.8) des Patienten (VI.5) trägt ebenfalls die homozygote Variante.

**Tab. 23: Genotypisierung von rs3208837 in der konsanguinen marokkanischen Familie**

Familienmitglied	Geschlecht	Genotyp (rs3208837)	Phänotyp
III.5	männlich	T/C	gesund
III.10	weiblich	C/C	gesund
IV.3	weiblich	T/C	gesund
IV.7	weiblich	T/C	gesund
IV.8	männlich	T/C	gesund
VI.1	männlich	T/C	gesund
<b>VI.2</b>	<b>männlich</b>	<b>T/T</b>	<b>KBE-Patient</b>
VI.3	weiblich	C/C	gesund
VI.4	männlich	T/C	gesund
<b>VI.5</b>	<b>männlich</b>	<b>T/T</b>	<b>KBE-Patient</b>
VI.6	weiblich	T/C	gesund
VI.7	weiblich	T/C	gesund
<b>VI.8</b>	<b>weiblich</b>	<b>T/T</b>	<b>gesund</b>
VI.9	weiblich	C/C	gesund
VI.15	männlich	T/C	gesund
VI.16	weiblich	C/C	gesund
VI.17	weiblich	C/C	gesund

Unter der Annahme einer verminderten Penetranz könnte, trotz Homozygotie für die Variante rs3208837 bei der gesunden Schwester, diese Variante in die Ätiologie der KBE involviert sein. Daher wurden weitere 378 BEEK-Patienten und 380 gesunde Kontrollen mittels Sanger-Sequenzierung für diese Variante genotypisiert (s. Tab. 24).

**Tab. 24: Genotypen und Allelfrequenzen von rs3208837 in 378 BEEK-Patienten und 380 gesunden Kontrollen**

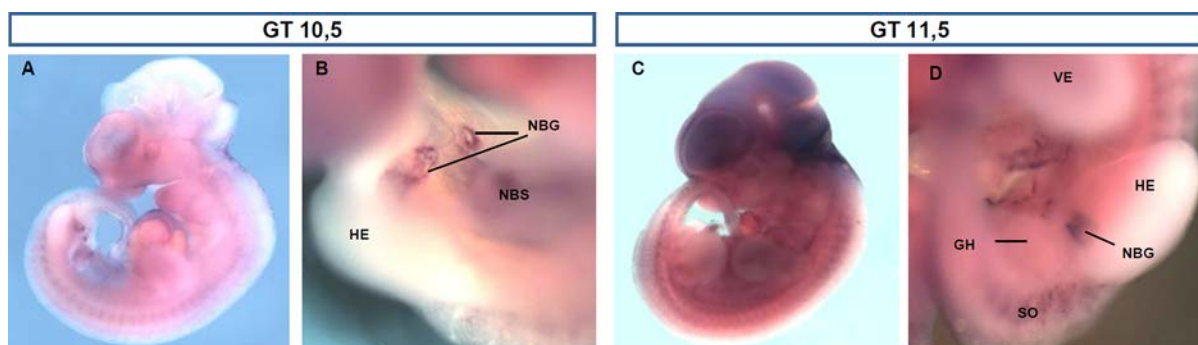
	Genotypen				Allelfrequenzen		
	Anzahl	C/C	T/C	T/T	Allele [absolut]	C [%]	T [%]
<b>Patienten</b>	378	346	29	3	756	95,37	4,63
<b>Kontrollen</b>	380	356	23	1	760	96,71	3,29

Ausgehend von den Ergebnissen der Genotypisierung wurde eine Frequenz (s. Tab. 24) von 0,0463 in Patienten zu 0,0329 in Kontrollen ermittelt.

#### 4.1.2.3 Kandidatengenanalyse für *CYR61*

Der nichtsteroidale Androgenrezeptor-Antagonist Flutamid (FLU, -Methyl-*N*-[4-nitro- 3-(trifluormethyl) phenyl] propionsäureamid) wird bei der Behandlung von Prostatakrebs eingesetzt. Eine einmalige Applikation von FLU während der Gestation führt bei der Ratte reproduzierbar bei 12 % der männlichen Nachkommen zu E oder zu anderen Fehlbildungen der Genital- und Fortpflanzungsorgane (McIntyre et al., 2001; Foster & Harris, 2005). Untersuchungen der Genexpression in fetalen Rattenhoden haben gezeigt, dass eine FLU-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der Expression von *Cyr61* (cysteine-rich protein 61 gene) führt (Vo et al., 2009). Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass *CYR61* einen Einfluss auf die Proliferation, Migration und Adhäsion von Endothelzellen und Fibroblasten (Kireeva et al., 1996) durch Vermittlung ihrer Reaktion auf Wachstumsfaktoren hat (Lau & Nathans, 1985). Durch Hemmung der mesodermalen und endodermalen Differenzierung trägt *CYR61* zudem zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustandes embryonaler Stammzellen der Maus bei (Bourillot et al., 2009).

Die in Kooperation mit dem MPI in Berlin durchgeführte WISH zeigte eine ventrokaudale Expression von *Cyr61* in den GT 9,5 bis 11,5 der Maus mit eindeutiger Beschränkung auf das Endothel des Gefäßsystems (s. Abb. 17).



**Abb. 17: WISH- Expressionsanalyse von *Cyr61* nach Draaken et al. (2010a)**

Expressionsmuster von *Cyr61* in den Entwicklungsstadien GT 10,5 und GT 11,5 der Mausembryonen. In den Übersichtsbildern A und C zeigt sich eine schwache Expression in den Spinalganglien, die sich entlang der lateralen Körperachse erstreckt. In den Detailbildern B und D zeigen sich Färbungen in den Gefäßen der Harnblase und der Nabelschnuranlage. GH: Genitalhöcker, HE: Hinterextremitätenknospen, NBG: Nabelschnurgefäße, NBS: Nabelschnuranlage, SO: Somiten, SPG: Spinalganglien, UGS: Urogenitalsinus, VE: Vorderextremitätenknospen.

Aufgrund dieser Expressionsdaten und der aufgeführten Tiermodelle handelt es sich bei *Cyr61* um ein exzellentes Kandidatengen. Mutationen im menschlichen *CYR61*-Ortholog

könnten eine Rolle bei der Entwicklung des Urogenitalsystems spielen und E oder ggf. auch KBE verursachen.

Für die Untersuchung konnten elf (sechs männliche und fünf weibliche) Patienten mit E eingeschlossen werden. Darüber hinaus wurde die Mutationsanalyse um acht (sechs männliche und zwei weibliche) Patienten mit KBE erweitert. Alle untersuchten Patienten haben einen normalen Karyotyp sowie eine unauffällige Familienanamnese.

Analysiert wurden alle *CYR61*-Exons sowie die angrenzenden Spleißstellen (Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sowie etablierte PCR- und Sequenzierungsbedingungen s. Anhang G). Es wurden 16 Varianten gefunden, die aber in dbSNP als polymorph beschrieben sind. Somit konnte keine pathogene Mutation bei der Analyse des *CYR61*-Genes identifiziert werden (Draaken et al., 2010a).

#### 4.1.2.4 Kandidatengenanalyse für *WIZ*

Der Analyse von *WIZ* (widely interspaced zinc finger motifs) ging der Befund einer *de novo* 0,9 Mb-Mikroduplikation auf Chromosom 19p13.12 in einem Patienten voraus (Kapitel 4.1.1.2). Diese Region beinhaltet 20 validierte RefSeq-Gene. Um einen umfassenden Überblick über die transkriptionelle Aktivität dieser Gene während der Entwicklung des äußeren Genitals zu erhalten, wurde zunächst in Kooperation mit dem MPI in Berlin eine WISH für die mausorthologen Gene durchgeführt. Der Schwerpunkt der Analyse lag auf dem Nachweis einer ventrokaudalen Expression zum GT 9,5 und 10,5.

Fünf Gene konnten nicht aus embryonaler cDNA amplifiziert werden und wurden daher nicht weiter untersucht. Darüber hinaus gibt es für drei weitere Gene kein Maus-Ortholog, so dass eine WISH-Analyse der verbleibenden zwölf Gene durchgeführt wurde.

Einige Gene zeigten keine Expression in dem Untersuchungsstadium bzw. konnten ubiquitär nachgewiesen werden, so dass nur Transkripte für Orthologe der menschlichen Gene *CASP14*, *AKAP8*, *SYDE1*, *BRD4*, *CYP4F22* und *WIZ* gefunden wurden, die speziell im Enddarm und/oder kaudalen Bereich exprimiert werden (s. Tab. 25).

Tab. 25: Expression der mausorthologen Gene in der Duplikationsregion auf Chromosom 19p13.12

Gen	Maus Ortholog	Expression an GT 9,5	Expression an GT 10,5
<i>CASP14</i>	<i>Casp14</i>	Enddarm	Auge
<i>AKAP8</i>	<i>Akap8</i>	ubiquitär	begrenzt auf die Extremitätenknospen, Schwanz (Kloakenmembran)

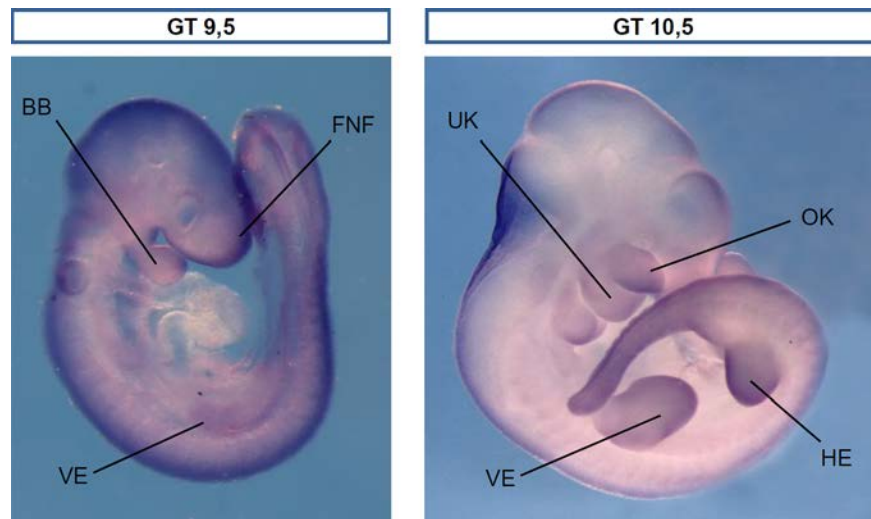


<i>SYDE1</i>	<i>Syde1</i>	ubiquitär	eingeschlossen), Branchialbogen und frontonasaler Fortsatz (FNF) begrenzt auf die Extremitätenknospen, Schwanz (Kloakenmembran eingeschlossen), Branchialbogen und FNF
<i>BRD4</i>	<i>Brd4</i>	ubiquitär, stärker in FNF Branchialbogen und Extremitätenknospen	ubiquitär, stärker in den Extremitätenknospen, Schwanz (Kloakenmembran eingeschlossen), Branchialbogen und FNF
<i>CYP4F22</i>	<i>Cap4f39</i>	Enddarm	keine Expression
<i>WIZ</i>	<i>Wiz</i>	ubiquitär mit erhöhter Expression in der kaudalen Region	Stärker exprimiert in der kaudalen Region, Neuralrohr, Branchialbogen und Extremitätenknospen

*Wiz* wurde im murinen Embryo am GT 9,5 ubiquitär mit starker Expression in der kaudalen Region nachgewiesen. Zudem ist *Wiz* im Neuralrohr, im Branchialbogen, im FNF und in der Knospe der Vorderextremitäten exprimiert (s. Abb. 18A). Die Expression am GT 10,5 zeigte ein ähnliches Muster wie am GT 9,5. Zudem ist *Wiz* auch in den Bereichen des Ober- und Unterkiefers des Branchialbogens, der Knospen der Vorder- und Hinterextremitäten sowie des Schwanzes exprimiert (s. Abb. 18B). *Wiz* ist im Mausembryo während der Entwicklung des Genitalbereichs an den Gestationstagen 9,5 bis 13,5 (GT 11-13,5 nicht gezeigt) in der ventrokaudalen Region spezifisch exprimiert.

Angesichts dieser Beobachtung wurde auch die midsaggitale Ebene bei GT 12,5 (s. Abb. 18D), GT 13,5 (s. Abb. 18E), und GT 14,5 (nicht dargestellt) analysiert. Alle GTe zeigten ein ähnliches Muster, mit nachgewiesener starken *Wiz* Expression im Gehirn, FNF, Schwanz, Genitalhöcker, Neuralrohr und Lunge.

*Wiz* ist an allen relevanten Tagen im Zielgewebe exprimiert, die anderen Gene hingegen nicht oder nur an GT 9,5. Nach den Expressionsdaten des Orthologes ist *WIZ* das vielversprechendste Kandidatengen aus der duplizierten Region auf Chromosom 19.



**Abb. 18: WISH-Expressionsanalyse von *Wiz* nach Draaken et al. (2013)**

Expressionsmuster von *Wiz* in den Entwicklungsstadien GT 9,5 und GT 10,5 der Mausembryonen zeigt eine spezifisch Expression in der ventrokaudalen Region. Am GT 9,5 zeigt sich zudem eine Expression im BB, den VE sowie im FNF.

Am GT 10,5 zeigen sich Färbungen am UK und OK des BB, sowie im Bereich der VE und HE. BB: Brachialbogen, FNF: frontonasaler Fortsatz, HE: Hinterextremitätenknospen, OK: Oberkiefer, UK: Unterkiefer, VE: Vorderextremitätenknospen.

Alle neun kodierenden Exons mit angrenzenden Spleißstellen des humanen *WIZ*-Gens wurden in 110 BEEK-Patienten (alle Patienten aus der CNV Analyses aus Kapitel 4.1.1.2) mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sowie die etablierten Amplifikations- und Sequenzierungsbedingungen sind im Anhang H aufgelistet.

Es wurden bei der Sequenzierungsanalyse vier bisher nicht beschriebene Varianten detektiert. Bei drei Varianten handelt es sich um nicht-synonyme Varianten (c.G544A, p.Asp182Asn; c.G1132C, p.Glu378Gln; c.C4436T, p.Pro1479Leu). Von diesen wurden die zwei Varianten c.G544A und c.G1132C vom gesunden Vater sowie die dritte Variante c.C4436T von der gesunden Mutter der Patienten vererbt. Die Programme MutationTaster, PolyPhen-2 und MutPred (zur Vorhersage einer potentiell pathogenen Variante) klassifizieren diese nicht-synonymen Varianten als benigne (s. Tab. 26).

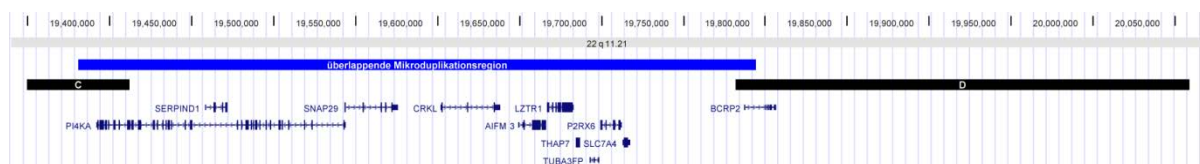
**Tab. 26: Analyse der gefundenen drei Varianten in *WIZ***

Position der Variante		Vorhersageprogramm		
genomisch	Codon	MutPred	PolyPhen-2	MutationTaster
c.G544A	p.Asp182Asn	benigne (0,273)	benigne (0,146)	Polymorphismus
c.G1132C	p.Glu378Gln	benigne (0,219)	möglicherweise schädigend (0,802)	Polymorphismus
c.C4436T	p.Pro1479Leu	benigne (0,000)	benigne (0,254)	Polymorphismus

Für die gefundene synonyme Variante (c.C4377T, p.Gly1459=) wurde die Segregation nicht überprüft. Abschließend wurden alle bekannten SNPs hinsichtlich ihrer Frequenz mit dbSNP ohne abweichenden Befund analysiert. Somit erbrachte die Kandidaten-Gen-Analyse nicht den Hinweis, dass Mutationen im humanen *WIZ*-Gen kein häufiger Grund für die Entstehung des BEEK beim Menschen sind (Draaken et al., 2013).

#### 4.1.2.5 Kandidatengenanalyse für *SNAP29* und *CRKL*

Basierend auf den Befunden der Untersuchung der Duplikation auf Chromosom 22 (Kapitel 4.1.1.1 und 4.1.2.1) sollten pathologisch relevante Gene identifiziert werden. Von der Mikroduplikation sind insgesamt 46 Gene betroffen und daher wurde der Fokus zunächst auf die kleinste gemeinsame überlappende Region aller acht betroffenen Patienten gelegt. Diese wurde basierend auf den Array- und NGS-Daten ermittelt (s. Tab. 15 und Tab. 21). In der überlappenden Region (chr22:19.380.613-19.794.371) liegen die elf Gene (s. Abb. 19) *PI4KA* (phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha), *SERPIND1* (serpin peptidase inhibitor, clade D [heparin cofactor], member 1), *SNAP29* (synaptosomal-associated protein, 29kDa), *CRKL* (v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog [avian]-like), *AJFM3* (kein Datenbankeintrag), *LZTR1* (leucine-zipper-like transcription regulator 1), *THAP7* (THAP domain containing 7), *TUBA3FP* (tubulin, alpha 3f, pseudogene), *P2RX6* (purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 6), *SLC7A4* (solute carrier family 7 (orphan transporter), member 4) und *BCRP2* (breakpoint cluster region pseudogene 2).



**Abb. 19: Überlappende Mikroduplikationsregion auf Chromosom 22 in acht KBE-Patienten**

Dargestellt ist mittels UCSC Genome Browser (hg18) der kleinste gemeinsam überlappende Bereich (blau) der acht Mikroduplikationen. Darüber ist die genomische Position und die betroffenen Chromosomenbanden aufgetragen. Die involvierten LCR (low copy repeat)-Regionen C und D sind schwarz dargestellt. Darunter sind die elf darin kartierenden RefSeq-Gene illustriert.

Nach MGI- und Literaturrecherche konnten *SNAP29* und *CRKL* als potentielle Kandidatengene identifiziert werden. *SNAP29* bindet durch die Interaktion mit

verschiedenen anderen Syntaxinen an Membranstrukturen (Steegmaier et al., 1998; Hohenstein & Roche, 2001). So partizipiert *SNAP29* an unterschiedlichen intrazellulären Transportschritten und interagiert bei der Trennung von Membrankompartimenten (Steegmaier et al., 1998). Andererseits konnte bei einer Überexpression von *Snap29* nachgewiesen werden, dass die Phagozytose beeinflusst wird und *Snap29* dadurch den Schutz gegen bakterielle Infektionen beeinflussen kann (Wesolowski et al., 2012). Darüber hinaus zeigten Zhang et al. (2009b), dass Mutationen im *SNAP29* mit einer fehlerhaften Entwicklung des Genitalsystems assoziiert sein kann (Zhang et al., 2009b). *Crkl* beeinflusst gewebespezifisch während der Entwicklung die Funktion, Differenzierung und/oder das Überleben von neuronalen Leistenzellen (Guris et al., 2001). *Crkl* interagiert mit *Fgf8* (Moon et al., 2006) und eine Überexpression von *Crkl* führt zu einer Transformierung von Fibroblasten (Senechal et al., 1996). *Crkl* Knockout-Mäuse zeigen einen Phänotyp vergleichbar mit der klinischen Manifestation bei DiGeorge-Patienten (Guris et al., 2001; Moon et al., 2006).

Für die Sequenzierungsanalyse wurden 95 KBE-Patienten ohne Duplikation der betroffenen Region auf Chromosom 22 ausgewählt und alle kodierenden Exons von *SNAP29* (fünf Exons) und *CRKL* (drei Exons) inklusive der Spleiß-Motive sequenziert (s. Anhang I). Dabei konnte keine homozygote oder heterozygote Variante abweichend von dbSNP detektiert werden.

## **4.2 Genetische Untersuchungen bei Patienten mit isolierter anorektaler Malformation (ARM)**

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Analysen von isolierten ARM-Patienten vorgestellt. Es konnte eine Duplikation (Kapitel 4.2.1.1) und eine Deletion auf Chromosom 18 (Kapitel 4.2.1.2) identifiziert werden. Eine Kandidatengenanalyse wurde für ausgewählte Gene der WNT- und FGF-Signalwege (Kapitel 4.2.2) durchgeführt.

### 4.2.1 Analysen der Kopienzahlveränderungen bei ARM

Im Kapitel 4.2.1.1 werden die Untersuchungen zur Identifizierung ursächlicher CNVs in 13 ARM-Patienten vorgestellt. Die Ergebnisse eines Einzelfalls werden im daran anschließenden Kapitel 4.2.1.2 präsentiert.

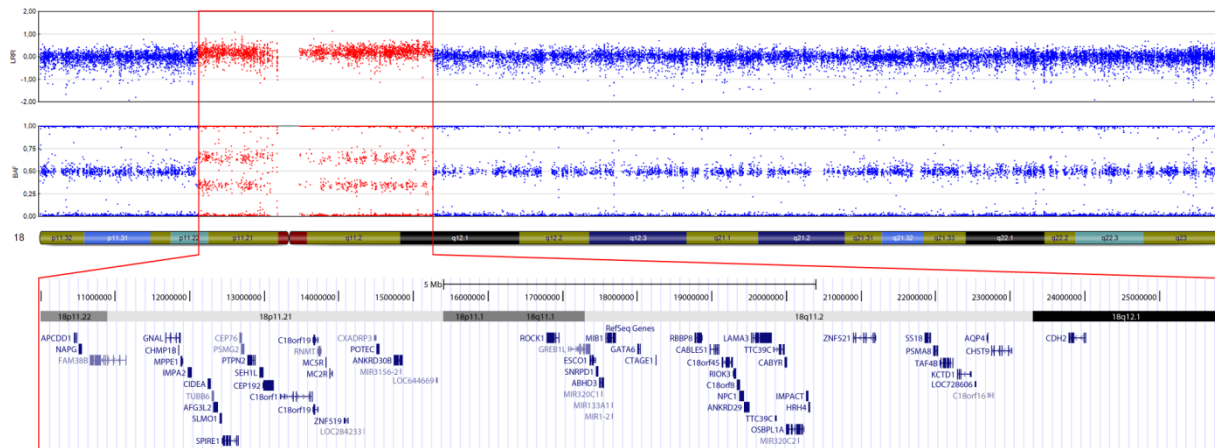
#### 4.2.1.1 Duplikation auf Chromosom 18

Viele ARM-Phänotypen sind mit einer reduzierten Reproduktion assoziiert. Daher könnte ein beträchtlicher Anteil der Patienten durch *de novo* Mutationen unterschiedlicher Größe bedingt sein. Es wurde eine systematische CNV-Analyse von 13 ARM-Patienten und deren gesunden Eltern durchgeführt. Die parallele Untersuchung der Patienten und Eltern erlaubt die Identifizierung von *de novo* Mutationen. Für die vorliegende Analyse wurden Patienten sowohl mit eindeutigen klinischen Syndromen, wie z. B. Currarino Syndrom, Townes-Brocks-Syndrom oder VATER/VACTERL-Assoziation als auch mit einer positiven Familienanamnese ausgeschlossen.

Sechs Familien wurden auf dem H660W und sieben Patienten mit Eltern auf dem OMNI BeadChip von Illumina nach Protokoll des Herstellers genotypisiert. Die Elternschaft wurde zunächst mithilfe der genotypisierten Markerinformationen für jedes Trio bestätigt (Kapitel 3.3.1.4). Die mittels QuantiSNP prognostizierten CNV-Befunde wurden wie folgt gefiltert (Kapitel 3.5):

- Schwellenwerte (größer oder gleich): 30 Kb; logB 7; mindestens drei betroffene Marker,
- *de novo* Ereignis,
- maximal dreimaliges Vorkommen im Kontrollkollektiv,
- Involvierung kodierender Sequenzen (Geninhalt),
- maximal dreimaliges Vorkommen in öffentlich zugänglichen CNV-Datenbanken und
- visuelle Kontrolle und Beurteilung in GS.

Nach diesen Filterschritten verblieb eine *de novo* 15,1 Mb große Duplikation 18p11.21-q12.1 (s. Abb. 20) bei einem weiblichen Patienten (351-501). Es wurde kein weiterer *de novo* CNV bei einem der anderen zwölf Patienten identifiziert.



**Abb. 20: Duplikation 18p11.21-q12.1 nach Schramm et al. (2010)**

Das Chromosomenideogramm in der Mitte verdeutlicht die genomische Position auf Chromosom 18 in Beziehung zur Markerannotation im Referenzgenom unter Verwendung des Human660W-Quad BeadChips von Illumina. Das Log-R-Verhältnis (LRR) streut deutlich über 0 und weist in Verbindung mit der Bildung von vier Clustern der B-Allel-Frequenz (BAF) auf eine Duplikation der chromosomalen Region 18p11.21-q12.1 hin. Die duplizierten Marker sind rot dargestellt. Unterhalb des Ideogramms ist die betroffene Region im UCSC Genome Browser mit den darin kartierenden RefSeq-Genen dargestellt.

Die Region umspannt die genomische Position chr18:10.316.596-25.417.449 und beinhaltet 52 RefSeq-Gene. Die Bruchpunktregionen auf Chromosom 18 können auf die Bereiche zwischen Position 1.0313.660 und 10.316.595 bzw. zwischen 25.417.450 und 25.433.122 eingeschränkt werden. Durch eine Haplotypenanalyse konnte die *de novo* Duplikation dem paternal vererbten Allel zugewiesen werden. In der auswärtig durchgeführten konventionellen Chromosomenanalyse zeigte sich ein weiblicher Karyotyp (46,XX) mit einer Mikroduplikation ausschließlich auf dem q-Arm von Chromosom 18.

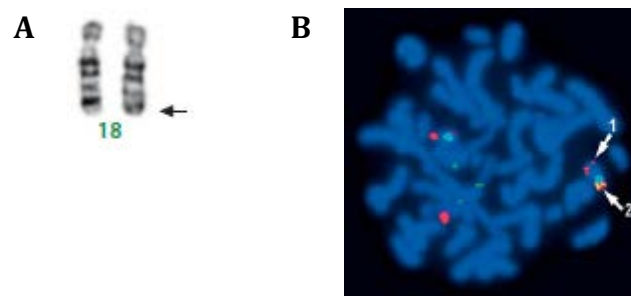
Neugeborene mit kompletter Trisomie 18 zeigen häufig eine angeborene ARM. Die im vorliegenden Fall duplizierte chromosomale Region 18p11.21-q12.1 ist die bisher kleinste identifizierte duplizierte Region auf dem Chromosom, die mit dem Auftreten einer isolierten ARM assoziiert wurde. Daher könnte eines der im Bereich der Bruchpunkte oder der Duplikation selbst kartierten 52 Gene an der Entstehung einer ARM beteiligt sein.

#### 4.2.1.2 Deletion 18q-Syndrom

Bei einem Patienten mit Analatresie wurden u. a. zusätzlich Hypospadie, Atresie der Hörkanäle, gedrungener Status, Hypoplasie des Mittelgesichts und eine verzögerte motorische Entwicklung diagnostiziert. Aufgrund negativer Familienanamnese und der

multiplen kongenitalen Anomalien wurde eine *de novo* chromosomale Aberration vermutet. Die phänotypischen Auffälligkeiten deuten bis auf die ARM auf ein 18q-Deletionssyndrom hin.

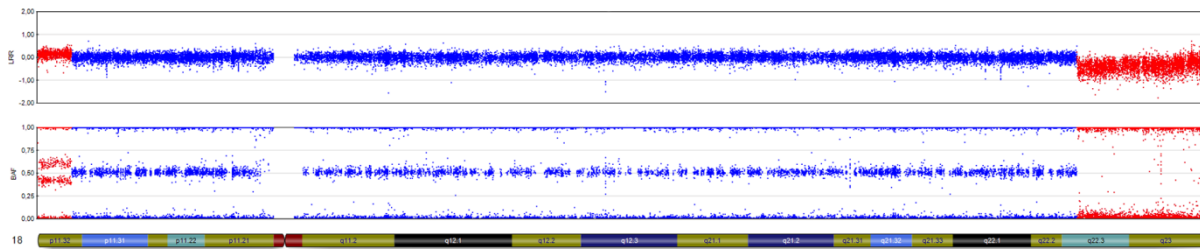
Die auswärts durchgeführte Chromosomenanalyse und FISH zeigten eine terminale Deletion der Chromosomenbande 18q23 und eine Duplikation in der Region 18p11.32 (s. Abb. 21). Daraus ergibt sich der Karyotyp: 46,XY,del(18)(pter→q23:)dn.ishder(18)del(18)dup(18)(pter→p11.32::q23→pter). Beide Aberrationen konnten unter Verwendung der gleichen Methoden bei den Eltern nicht detektiert werden und deuten den Befund als ein *de novo* Ereignis.



**Abb. 21: Kariogramm und FISH-Analyse beim Patienten mit 18q-Deletionssyndrom nach Bartels et al. (2011)**

Im 550-Banden-Karyogramm (A) wurde die terminale Deletion 18q23 detektiert. Die FISH-Analyse (B) bestätigt (1) diesen Befund unter Verwendung der Sonde VljyRM2102. Der zusätzliche duplizierte Bereich 18p11.32 wurde mit der Sonde VljyRM2050 verifiziert(2).

Um die Größe der beiden Aberrationen genauer zu bestimmen, wurden nach Herstellervorgaben genomweite Genotypisierungsdaten unter Verwendung des OMNI BeadChip von Illumina erhoben und mittels QuantiSNP potentielle CNVs berechnet. Die Abb. 22 zeigt das visualisierte Ergebnis in GS. Orientiert am Chromosom 18 (unten) ist das LRR oben und darunter die BAF dargestellt. Die Duplikation (18pter–p11.32) konnte auf eine Größe von 2,23 – 2,25 Mb eingegrenzt werden. Bei dem letzten sicher duplizierten Marker handelt es sich um rs7228408 an genomischer Position 2.233.990. Der flankierende Marker rs12605414 ist an Position 2.247.352 lokalisiert. Die Deletion (18q22.3–qter) konnte auf 13,19 Mb eingegrenzt werden. Der erste sicher deletierte Marker rs7230918 befindet sich an der genomischen Position 62.928.529 und der sicher nicht mehr deletierte Marker rs4410187 an Position 62.923.071 [arr 18p11.32 (2.842-2.233.990x3, 18q22.3-q23 (62.928.529-76.116.152)x1dn].



**Abb. 22: Aberrationen auf Chromosom 18 nach Bartels et al. (2011)**

Das Chromosomenideogramm unten verdeutlicht die genomische Position auf Chromosom 18 in Beziehung zur Markerannotation im Referenzgenom unter Verwendung des HumanOmni1-Quad BeadChips von Illumina. Das Log-R-Ratio (LRR) streut links deutlich über 0 und weist in Verbindung mit der Bildung von vier Clustern der B-Allel Frequenz (BAF) auf eine Duplikation der chromosomalen Region 18pter–p11.32 hin. In der Abbildung ist zudem rechts eine heterozygote Deletion der Region 18q22.3–qter zu sehen. Hier streut das LRR deutlich unter 0 und es fehlt das heterozygote BAF-Cluster um 0,5.

Die Duplikation beinhaltet auf dem kurzen Chromosomenarm (10q) zehn RefSeq-Gene, in der Deletion auf 10p kartieren 33 RefSeq-Gene. Die Analyse der Bruchpunkte mittels genomweiter Array-Daten ergab in den Bruchpunktbereichen keine Ruption eines Gens. Es konnten darüber hinaus keine weiteren chromosomalen Aberrationen auf anderen Chromosomen detektiert werden.

#### 4.2.2 Kandidatengenanalyse für ausgewählte Gene der WNT- und FGF-Signalwege

Die aus mehreren intrazellulären Kaskaden bestehenden Prozesse der urogenitalen- und anorektalen Embryogenese werden unter anderem durch die WNT- (wingless-type Maus-Mammatumovirus [MMTV] integration site family) und FGF- (fibroblast growth factor) Signalkaskaden koordiniert. Studien an Mäusen implizieren, dass mehrere Gene aus diesen Signalkaskaden in die Entwicklung des Enddarms eingebunden sind. Aufgrund von bisher publizierten funktionellen Studien wurden folgende Gene ausgewählt:

##### *WNT3A*

Mäuse, die homozygot für ein hypomorphes *Wnt3a* (wingless-type MMTV integration site family, member 3A) Allel sind, zeigen Wirbelkörperdefekte (vertebrale Defekte), einen kurzen Schwanz durch den Verlust der Schwanzwirbel, mangelhafte Kloakenentwicklung sowie eine unvollständige uro-rektale Septierung (van de Ven et al.,



2011). Außerdem haben Studien mit humanen pluripotenten Stammzellen gezeigt, dass *Wnt3a* für die Spezifikation des Enddarms erforderlich ist (Spence et al., 2011).

#### *WNT5A*

*Wnt5a* (wingless-type MMTV integration site family, member 5A) ist im embryonalen Kolon und Rektum exprimiert und beeinflusst die Entwicklung der proximalen Kloakenplatte (Nakata et al., 2009). *Wnt5a*-Knockout-Mäuse zeigen ARM-phänotypische Auffälligkeiten, wie Analatresie oder Fisteln zwischen dem Harn- und Darm-Trakt (Tai et al., 2009).

#### *WNT11*

*Wnt11* (wingless-type MMTV integration site family, member 11) trägt ebenfalls zur Entwicklung des Urogenitaltraktes der Maus bei (Mehta et al., 2011). Die Expression des menschlichen *WNT11* konnte im embryonalen uro-rektalen Septum, in den urogenitalen Falten, in den labioskrotalen Schwellungen sowie im Epithel der Speiseröhre und Dickdarm in zwei Studien gezeigt werden (Lako et al., 1998; Lickert et al., 2001). Des Weiteren konnten Studien an chinesischen Hamster-Eierstock-Zellen zeigen, dass eine *Wnt11*-Signal-Transduktion zu einer Herunterregulation der zentralen Signalwege *Wnt*/ $\beta$ -Catenin, JNK/AP-1 und NF- $\kappa$ B führt (Rai et al., 2008).

#### *T-Gen*

Die Signaltransduktion kann auch auf der Ebene einzelner Genpromotoren auftreten (Haremba et al., 2003). Das *T-Gen* (T-box containing transcription factor, Synonym: *Brachyury*) ist ein direktes Ziel des *WNT3A* Signalweges während der paraxialen mesodermalen Spezifikation (Yamaguchi et al., 1999). Ein nicht-synonymer Aminosäureaustausch (p.Ala338Val) wurde in vier Patienten mit sakraler Agenesie/anorektaler Atresie assoziiert (Papapetrou et al., 1999; Ghebranious et al., 2008).

*DACT1*

Dact1 (Dapper Homolog 1) fungiert u. a. als negativer Regulator des Wnt-Signalweges. *Dact*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse, die phänotypisch mit dem humanen kongenitalen kaudalen Regressions-Syndrom vergleichbar sind (Wen et al., 2010), sterben perinatal (Cheyette et al., 2002).

*FGF10*

Eine wichtige Rolle spielt FGF10 (fibroblast growth factor 10) bei der Regulation des Wachstums, der Differenzierung und der Reparatur des Urotheliums (Bagai et al., 2002). Der vollständige Knockout von *Fgf10* bei Mäusen führt zu einer genetisch reproduzierbaren ARM (Fairbanks et al., 2004) und einer fehlenden Fusion der ventralen Urethralplatten (Yucel et al., 2004).

*FGFR2*

Die Wirkung des Signalproteins FGF10 wird durch FGFR2 (FGF-Rezeptor 2) vermittelt. Mutationen im FGFR2 führen zu unterschiedlichen Formen des autosomal dominanten Kraniosynostose-Syndroms und wurden mit syndromalen ARM-Patienten assoziiert (Ohashi et al., 1993; LeHeup et al., 1995; Park et al., 1995a, 1995b; Pfeiffer et al., 1996; Przylepa et al., 1996; Krepelová et al., 1998; Schaefer et al., 1998; Kodaka et al., 2004).

Um die Beteiligung der oben genannten Gene bei der Entstehung humaner ARM zu untersuchen, wurden die kodierenden Sequenzen (inklusive der Spleiß-Motive) von Karyotyp-unauffälligen 78 ARM-Patienten mit zusätzlichen angeborenen Anomalien analysiert (Draaken et al., 2012). Alle Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierungsreaktion sowie die etablierten Reaktionsbedingungen sind im Anhang J aufgelistet.

Es konnten für WNT3A, WNT5A, WNT11, DACT1, FGF10 und T-Gen keine kausalen Varianten detektiert werden. Für FGFR2 konnten drei unterschiedliche heterozygote Varianten bei der Sequenzanalyse bei drei Patienten identifiziert werden. Alle drei Varianten sind weder in dbSNP noch im 1000 Genome Projekt gelistet.

### Patient B10

Nachdem eine synonyme p.Thr454= Variante (c.G2012A Transition im Exon 12) im Patienten B10 identifiziert wurde, konnte bei der anschließenden Analyse der Eltern der gleiche Basenaustausch ebenfalls bei der Mutter des Patienten detektiert werden. Aufgrund der Umgebungssequenz dieser synonymen Substitution könnte es sein, dass daraus eine neue 3'-Akzeptor-Spleißstelle in Exon 12 entsteht. Die Kalkulation des Konsensus-Wertes (consensus value, CV) für eine Spleißstelle ergab einen CV von 0,913 für die WT (Wildtyp) Sequenz (5'-cattttgtatccag^G; Base im Exon in Großbuchstaben dargestellt) und einen CV von 0,917 für die neue Variante (5'-cctctcttcaacag^C; Substitution unterstrichen).

Die Ermittlung nahezu identischer CVs lässt den Schluss einer potentiellen alternativen Nutzung dieser Spleißstellen mit der möglichen Folge einer 76 bp Deletion (p.Ala455GlnfsX26) zu. Daher wurde eine RNA-Analyse durchgeführt. Dafür wurde aus cDNA ein Exon 12 übergreifendes Produkt mithilfe von cDNA Oligonukleotiden (ANHANG) amplifiziert. Es konnte jedoch kein neues 425 bp großes Fragment (normal, 501 bp) detektiert werden. Eine beobachtete Variation im RT-PCR-Produkt des Patienten ist bedingt durch alternatives Spleißen der Exon 11-Donorstelle. Dies führt zur Exklusion der Aminosäuren Val428 und Thr429, die in verschiedenen FGFR2-Isoformen vorliegt (s. Swiss-Prot-Eintrag P21802).

### Patient G10

Ebenfalls in Exon 12 wurde bei Patient G10 eine heterozygote Variante in FGFR2 (c.C2032T) detektiert. Dieser Basenaustausch führt zu einer Aminosäuresubstitution p.Ala461Val. Zur Untersuchung einer möglichen familiären Segregation stand nur DNA der Mutter zur Verfügung, deren Sequenz homozygot den WT zeigte.

Zur Einordnung des Befundes wurde mithilfe unterschiedlicher Programme die Wahrscheinlichkeit einer potentiellen Pathogenität der gefundenen Variante berechnet. Nach MutationTaster hat diese Variante eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, krankheitsverursachend zu sein (0,981). PolyPhen-2 (0,005), MutPred (0,235) und SNPs & Go (1) beurteilten die Variante jedoch als benigne.

#### Patient A02

Bei Patient A02 wurde eine synonyme FGFR2 Variante in Exon 18 (c.C2717T, p.Phe689=) gefunden. Diese hat vermutlich keine biologische Auswirkung und wurde für eine weitere Analyse nicht berücksichtigt.

Darüber hinaus wurden in den analysierten Sequenzen aller untersuchten Gene die Frequenzen der SNPs dokumentiert. Dabei konnte keine signifikante Abweichung im Vergleich zu den Frequenzdaten aus dbSNP detektiert werden.

### **4.3 Genetische Untersuchungen bei Patienten mit VATER/VACTERL-Assoziation**

Insgesamt wurden 47 Familien im Trio-Ansatz für die Analyse ausgewählt, d. h. sowohl Patienten als auch Eltern wurden auf dem OMNI Bead Chip nach Herstellervorgaben genotypisiert. Davon zeigten 41 Patienten das Vollbild der VATER/VACTERL-Assoziation und 6 einen inkompletten sog. VATER/VACTERL-ähnlichen Phänotyp (zwei statt der mindestens drei geforderten Fehlbildungen der Assoziation). Die Familienanamnese bzgl. der VATER/VACTERL-Assoziation bzw. Fehlbildungen aus dem Spektrum der VATER/VACTERL-Assoziation war in allen untersuchten Familien negativ.

Bevor mit QuantiSNP potentielle CNV prognostiziert wurden, konnte mithilfe von GS die Elternschaft in allen prozessierten Familien bestätigt werden. Aus der anschließenden Analyse mit QuantiSNP wurden 152.225 CNVs mit einem logB 7 in den Patienten detektiert und anschließend wie folgt gefiltert (Kapitel 3.5):

- *de novo* Ereignis,
- mindestens drei betroffene Marker,
- maximal dreimaliges Vorkommen im Kontrollkollektiv,
- Involvierung kodierender Sequenzen (Geninhalt),
- mindestens fünfmaliges Vorkommen in öffentlich zugänglichen CNV-Datenbanken und
- visuelle Kontrolle und Beurteilung in GS.

Nach den Filterschritten verblieben fünf potentielle *de novo* Aberrationen mit Geninhalt in fünf verschiedenen Patienten. Drei dieser CNVs konnten mittels qPCR (Oligonukleotidsequenzen s. Anhang D) als *de novo* bestätigt werden, während die anderen drei von einem Elternteil vererbt wurden (s. Tab. 27).

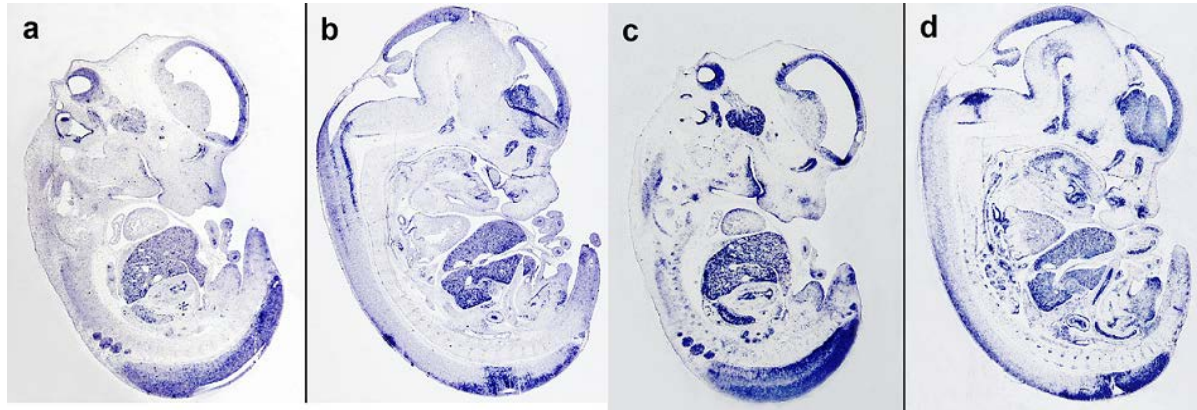
**Tab. 27: qPCR Ergebnisse der gefilterten CNV-Befunde in 47 VATER/VACTERL-Patienten**

Patient	genomische Position [hg18] Marker	Größe [Kb]	Aberration	qPCR- Ergebnis	betroffene Gene
424-501	chr1:215.945.774-216.077.064 rs10863338-rs4846444	132	Duplikation	<i>de novo</i>	<i>SPATA17</i>
707-501	chr2:241.202.666-241.227.781 rs2953147-rs4676406	25	Duplikation	<i>de novo</i>	<i>GPR35, CAPN10</i>
415-501	chr8:145.012.210-145.132.100 rs6990098-rs11136345	120	Duplikation	<i>de novo</i>	<i>EPPK1, PLEC, PARP10</i>
895-501	chr13:995.983.04-996.089.44 rs9300591-rs7998419	11	Deletion	paternal	<i>PCCA</i>
391-501	chr8:623.420.19-623.699.81 rs2119228-rs3852344	28	Duplikation	maternal	<i>CLVS1</i>

Bei Patient 424-501 wurde eine 132 Kb *de novo* Mikroduplikation auf Chromosom 1 (1q41) bestätigt. Der CNV überlappt die Exons 6 – 9 von *SPATA17* (spermatogenesis associated 17). Die 25 Kb *de novo* Mikroduplikation involviert die Exons 3 – 4 einer Spleißvariante von *CAPN10* (calpain 10) sowie die Exons 3 – 6 von *GPR35* (G protein-coupled receptor 35) und wurde in Patient 707-501 auf Chromosom 2 (2q37.3) detektiert. Der dritte CNV auf Chromosom 8 (8q24.3) wurde in Patient 415-501 gefunden. Es handelt sich um eine 120 kb *de novo* Mikroduplikation, die Exon 1 von *EPPK1* (epiplakin 1), das komplette Gen *PLEC* (plectin) sowie die Exons 4 – 11 von *PARP10* (poly [ADP-ribose] polymerase family, member 10) überlappt.

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen den gefundenen Mikroduplikationen und der VATER/VACTERL-Assoziation herzustellen zu können, wurde in der MGI-Datenbank gezielt nach Expressionsdaten und Knockout-Modellen der Maus für *Spata17*, *Capn10*, *Gpr35*, *Eppk1*, *Plec* und *Parp10* recherchiert. Dabei wurden potentiell relevante Gene priorisiert und auf *Gpr35* und *Eppk1* eingegrenzt. Die Expression von *Gpr35* an GT 14,5 wurde bei Mäusen im Magen, End-, Mast-, und Mitteldarm, sowie der Harnblase und Harnröhre dokumentiert. *Eppk1* wurde an GT 14,5 in der Epidermis, Lunge, Speiseröhre, dem Magen und dem Darm exprimiert beschrieben. Allerdings führt ein vollständiger knockout von *Eppk1* zu einer normalen Embryonalentwicklung (Goto et al., 2006), während kein Knockout Modell für *Gpr35* in Mäusen berichtet wurde.

Die Datenbankrecherche wurde durch WISH-Analysen an GT 12,5 und 14,5 für beide Gene am MPI in Berlin validiert. Abb. 23 illustriert die embryonale Expression von *Eppk1* (a und b) und *Gpr35* (c und d) u. a. für das VATER/VACTERL-Assoziation relevante Gewebe.



**Abb. 23: WISH-Expressionsanalyse von *Eppk1* und *Gpr35* nach Hilger et al. (in Druck)**

**a:** Die Expression von *Eppk1* an Gestationstag (GT) 12,5 im Mausembryo ist im Mittelhirn, Innenohr, Leber, Genitalhöcker, Spinalganglien und im Rückenmark nachweisbar. **b:** Nachweis der *Eppk1*-Expression in der Rathke-Tasche, Speiseröhre und im Nasengang an GT 14,5. **c:** *Gpr35* ist an GT 12,5 in der Leber, dem Trigeminalganglion, dem Gleichgewichts- und Höranglion, den Herzventrikeln, im Magen, im Genitalhöcker und den Spinalganglien exprimiert. **d:** Die Expression von *Gpr35* am GT 14,5 ist in der Leber, Striatum, Hypothalamus, der Zahnknospe, der Lunge, dem Genitalhöcker sowie im Rektum nachweisbar.

Als Kandidatengen wurde *GPR35* aufgrund der relevanten Expression im Mausembryo sowie der verfügbaren Literatur priorisiert. Die Sanger-Sequenzierung der proteinkodierenden Exons 5 und 6 wurde von Alina Hilger in Ann Harbor durchgeführt. Es wurden 192 Patienten, davon 126 mit VATER/VACTERL-Assoziation und 66 weitere mit VATER/VACTERL-ähnlichem Phänotyp analysiert. Es konnte keine Variante mit möglicher pathologischer Signifikanz detektiert werden und die zusätzlich durchgeführte Analyse bestätigte alle in dbSNP gelisteten Varianten mit einer Frequenz unter 1 % als vererbt, bis auf eine bei der die Eltern nicht zur Verfügung standen (Hilger et al., in Druck).

#### 4.4 Genetische Untersuchungen bei Patienten mit Prune-Belly-Syndrom (PBS)

Mit einer SNP-Chip-basierten genomweiten Kopplungsanalyse wurden in der konsanguinen Familie (s. Abb. 28) des Indexpatienten mit PBS (II-4) zwei homozygote Regionen auf den Chromosomen 1 (35 cM) und 11 (9 cM) in vier betroffenen männlichen Familienmitgliedern gefunden (Weber et al., 2005). Aufgrund der Größe der homozygoten Bereiche und der damit großen Anzahl enthaltener Gene, konnte zum damaligen Zeitpunkt kein kausales Gen identifiziert werden (Weber et al., 2005). Mithilfe einer Exomsequenzierung, bei der u. a. alle betroffenen Gene der Region analysiert werden können, sollte nun das verantwortliche Gen identifiziert werden.

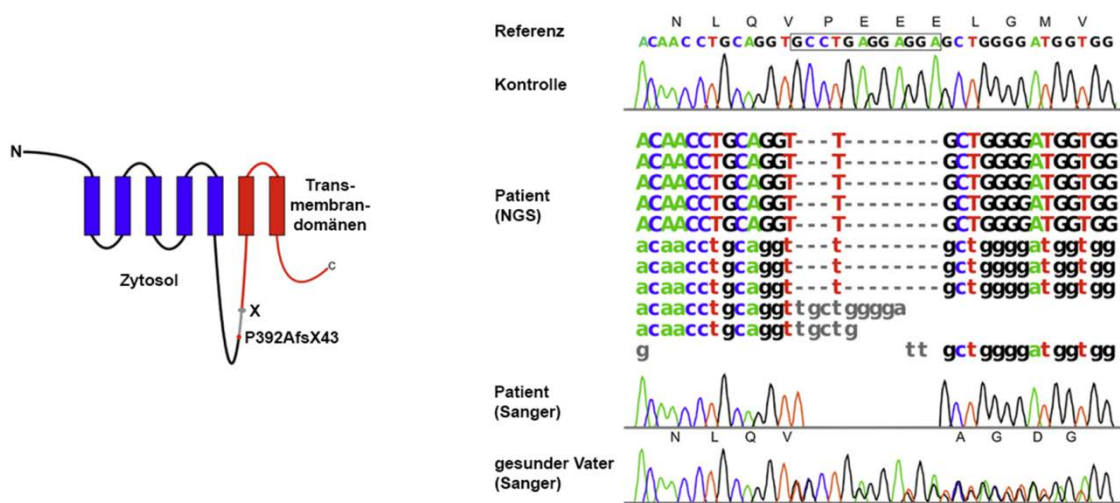
Die DNA des Indexpatienten wurde mit dem SureSelect Human All Exon (38 Mb) Kit (Agilent) für proteinkodierende Gene angereichert und zwei Läufe auf dem Illumina GAIIx Sequenzierer prozessiert. Dafür wurde das „paired-end“-Protokoll mit einer Leselänge von 95 bp an beiden Enden verwendet. Ungefähr 95,5 % ( $\sim 193 \times 10^6$ ) der  $202 \times 10^6$  Sequenzfolgen konnten gegen eine humane Referenzsequenz abgeglichen werden. Durchschnittlich 90 % des Exoms konnte mit mindestens 30-facher und 97 % mit 10-facher Abdeckung sequenziert werden.

Die anschließende bioinformatische Aufarbeitung der Daten wurde im CCG in Köln durchgeführt. Es konnten zunächst 672.588 Varianten identifiziert und gegen interne Qualitätsparameter sowie durch stringentes Filtern gegen bekannte Varianten in dbSNP, aus dem 1.000 Genome Projekt und internen Exomdaten, auf 48.811 Varianten reduziert werden. Im weiteren Filterschritt gegen homozygote Varianten (mit einer Allelfrequenz  $>75\%$ ) verblieben 38 Varianten, von denen zwei in den zuvor identifizierten Kopplungsregionen lagen.

Zum einen wurde eine missense-Variante in *HEATR1* (c.6037A > G;p.Lys2013Glu) und zum anderen ein Insertion-Deletions-Frameshift in *CHRM3* (c.1173\_1184 delinsT; p.Pro392Alafs\*43) detektiert (s. Abb. 24). *HEATR1* (HEAT repeat containing 1) ist involviert in die rRNA Transkription und Prozessierung und wird für das Zellüberleben im zentralen Nervensystem (ZNS) benötigt. Ein knockdown im Zebrafisch führt, verursacht durch eine Degeneration des ZNS, zu einem frühen embryonalen Tod (Azuma et al., 2006). Der beobachtete Phänotyp unterscheidet sich komplett von dem des Indexpatienten und dürfte daher nicht mit PBS assoziiert sein. Daher wurde für die

weitere Analyse der Fokus auf *CHRM3* (cholinergic receptor, muscarinic 3) gelegt. *CHRM3* ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomainen, deren Hauptrezeptor in die Blasenkontraktion während der Miktion involviert ist (Fowler et al., 2008). Abb. 24 zeigt im linken Teil die schematische Position der Mutation in *CHRM3*, die ein Stopp-Codon in der dritten intrazellulären Schlaufe (M3R) induziert.

Mittels Sanger-Sequenzierung (Oligonukleotidsequenzen und Reaktionsbedingungen s. Anhang K) konnte die detektierte Variante in *CHMR3* beim Indexpatienten (II-4) bestätigt werden (s. Abb. 24, rechter Teil).



**Abb. 24: Schematische Darstellung und NGS- bzw. Sanger-Sequenzierungsergebnis für die homozygote *CHRM3* Frameshift-Mutation nach Weber et al. (2011)**

Von oben nach unten ist im linken Teil der Abbildung zunächst die Referenzsequenz mit einer Kontrolle dargestellt. In der Mitte wird das aufeinander abgestimmte NGS-Ergebnis des Indexpatienten (II-4) illustriert. Die Kontrolle der Variante mittels Sanger-Sequenzierung bei II-4 sowie die heterozygote Sequenz der Mutter ist unten dargestellt.

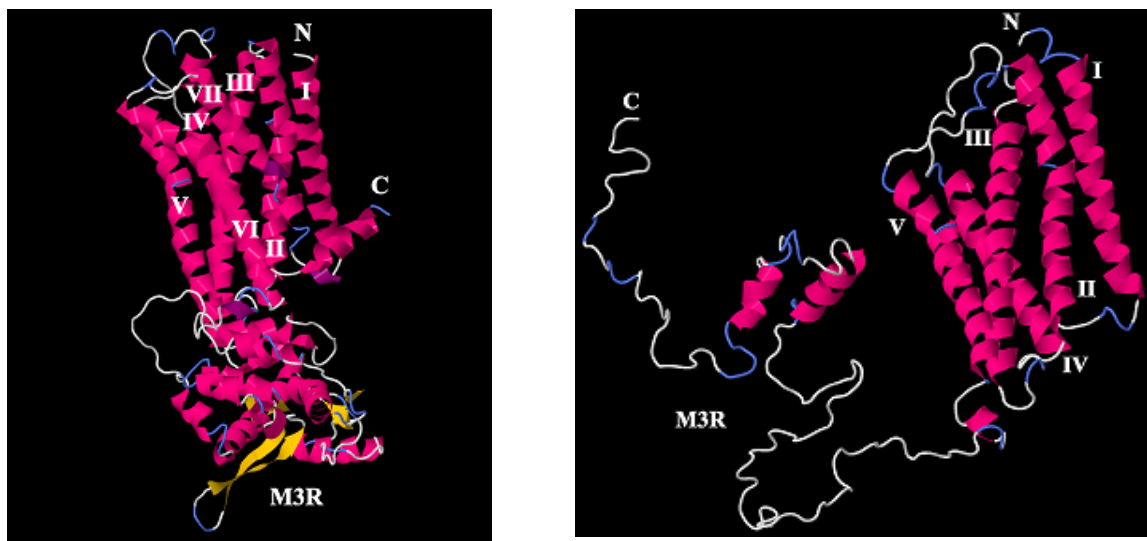
Anschließend wurden die Familienmitglieder II-2, II-3, II-5, II-6, II-7, I-1, und I-2 ebenfalls sequenziert. Die Analyse zeigt eine Co-Segregation der Variante c.1173\_1184 delinsT; p.Pro392Alafs\*43 in *CHRM3* in den betroffenen Familienmitgliedern und ist übereinstimmend mit dem vermuteten rezessiven Vererbungsmodell (Weber et al., 2005). Die Variante wurde weder in 374 türkischen Kontroll-Chromosomen gefunden, noch ist sie im Exome Variant Server annotiert.

Bei allen betroffenen männlichen Familienmitgliedern wurde die *CHRM3*-Variante homozygot gefunden. Im Gegensatz dazu konnten beide Elternteile und die gesunde Schwester (II-3) als heterozygote Anlageträger der Variante identifiziert werden. Die



Sanger-Sequenzierungsanalyse von 62 weiteren Patienten mit gleichem oder einem ähnlichen Phänotyp konnte keine weiteren Mutationen in *CHRM3* identifizieren.

Die Auswirkung der Stoppmutation auf die Proteinstruktur wurde mit dem Programm (PS)<sup>2</sup>-v2 (Chen et al., 2009) und den PDB Einträgen 2rh1, 2rh1A und 1r5sA prognostiziert und in Abb. 25 dargestellt. Es werden eine reduzierte Faltung der dritten intrazellulären Schleife (M3R) und ein zusätzlicher Verlust der transmembranen Helices VI und VII in der CHRM3-Mutante vorhergesagt.



**Abb. 25: Moduliertes 3D-Modell der CHRM3-Proteinstruktur nach Weber et al. (2011)**

Links ist die dreidimensionale Proteinstruktur des Wildtypes und rechts die dreidimensionale Proteinstruktur der mutierten CHRM3-Variante modelliert. Die transmembranen Helices (I-VII) sowie die Aminosäure-(N) und Carboxy-(C)-Termini sind angegeben. Es werden eine reduzierte Faltung der dritten intrazellulären Schleife (M3R) und ein zusätzlicher Verlust der transmembranen Helices VI und VII in der CHRM3-Mutante vorhergesagt. Die prognostizierte dreidimensionale Struktur beider Proteinvarianten wurde mit Jmol visualisiert. Die Zuverlässigkeit der vorhergesagten Modelle wird mit  $\geq 75$  % für WT und Mutante (mit Ausnahme des C-Terminus) bzw. 55 % bis 75 % für den C-Terminus der Mutante bewertet.

Die vorgestellten Ergebnisse wurden im American Journal of Human Genetics publiziert (Weber et al., 2011).

## 5 Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse (Kapitel 4) gegliedert und nach den unterschiedlichen Krankheitsbildern anhand der aktuellen Literatur diskutiert. Zunächst werden die Befunde zum BEEK (Kapitel 5.1), daran anknüpfend die Ergebnisse zur isolierten ARM (Kapitel 5.2), zur VATER/VACTERL-Assoziation (Kapitel 5.3) und abschließend zum PBS (Kapitel 5.4) erörtert.

### 5.1 Blasenektrophie-Epispadie-Komplex (BEEK)

Zunächst werden die CNV-Analysen mit den detektierten Duplikationen auf Chromosom 22 (Kapitel 5.1.1) und der Duplikation auf Chromosom 19 (Kapitel 5.1.2) diskutiert. Im Kapitel 5.1.3 schließt sich die Diskussion der CNV-Analyse in acht iranischen konsanguinen Familien, gefolgt von den Ergebnissen der NGS-Analyse einer konsanguinen marokkanischen Familie (Kapitel 5.1.4) an, den Abschluss bildet die Kandidatengenanalyse für *CYR61* (Kapitel 5.1.5).

#### 5.1.1 Duplikation auf Chromosom 22

Die chromosomale Region 22q11 ist anfällig für fehlerhafte genomische Reorganisationen, aus denen CNVs resultieren können. Verantwortlich sind hierfür nicht-allelische homologe Rekombinationen, die in den Region-spezifischen LCRs A bis D liegen (Lupski, 1998; Edelmann et al., 1999; Babcock et al., 2003; Shaikh et al., 2007; Guo et al., 2011). Vier unterschiedliche Syndrome sind für diese Region beschrieben. Hierbei handelt es sich um das

- 22q11.2 Deletionssyndrom VCFS/DGS; dieses schließt u. a. das velokardiofaziale Syndrom (VCFS) und das diGeorge-Syndrom (DGS) mit ein (Shprintzen et al., 1978; Kelley et al., 1982),
- 22q11.2 Duplikationssyndrom (Ensenauer et al., 2003; Portnoï, 2009),
- der(22) Syndrom (Zackai & Emanuel, 1980) und
- Katzenaugen-Syndrom (Schinzel et al., 1981).

Die beobachteten phänotypischen Merkmale von Mikroduplikationsträgern 22q11.21 werden allgemein als sehr variabel und häufig als sehr milde beschrieben (Ou et al., 2008). Die häufigsten Befunde in symptomatisch auffälligen Patienten sind Intelligenzminderung, verzögerte Sprachentwicklung, Wachstumshemmung und Muskelhypotonie (Wentzel et al., 2008). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es keine vorbeschriebenen Duplikationen der chromosomalen Region 22q11.21 in Zusammenhang mit dem phänotypischen Spektrum des BEEK.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einer initialen Untersuchung von 16 BEEK-Patienten und anschließender gezielter Analyse dieser Region in 50 weiteren BEEK-Patienten zwei Mikroduplikationen bei Patienten mit isolierter KBE detektiert (Draaken et al., 2010b). Bei Patient 27-501 wurde eine maternal vererbte Mikroduplikation und bei Patient 278-501 eine *de novo* Mikroduplikation der chromosomalen Region 22q11.21 (LCR A bis D) mittels MLPA und SNP-Array bestätigt (s. Tab. 15). Lundin et al. (2010) konnten in einer unabhängigen Untersuchung eine maternal vererbte und eine *de novo* Mikroduplikationen bei KBE-Patienten mit Hörminderung identifizieren, bei denen ebenfalls die LCRs A – D betroffen sind. Basierend auf diesen Befunden wurden in einer zweiten Untersuchungsreihe weitere 246 BEEK-Patienten auf das Vorliegen einer Mikroduplikation in dieser Region mittels MLPA-Analyse untersucht. In vier weiteren Patienten mit isolierter KBE konnten Mikroduplikationen auf 22q11.21 identifiziert und mittels SNP-Array verifiziert werden (s. Tab. 15). Die Bruchpunkte der *de novo* Mikroduplikation von Patient 182-501 liegen ebenfalls in den LCR-Regionen A und D. Bei Patient 87-51 ist die paternal vererbte Mikroduplikation zwischen den LCRs B bis D, genauso wie die *de novo* Mikroduplikation von Patient 3197. Die *de novo* Mikroduplikation von Patient 3053 erstreckt sich zwischen den LCRs C und D. Der *de novo* Status wurde jeweils mit MLPA-Analysen ermittelt.

Von den bisher insgesamt acht identifizierten Mikroduplikationen 22q11.21 in KBE-Patienten wurden drei von gesunden Eltern vererbt (zwei maternal und eine paternal; Lundin et al. (2010) und Tab. 14). Dies steht im Einklang mit anderen, überlappenden CNVs in dieser Region, bei denen ebenfalls phänotypisch unauffällige Träger berichtet wurden (Courstens et al., 2008). Es kann damit auch bei KBE-Familien, bei denen eine

Mikroduplikation 22q11.21 vorliegt, von einer verminderten Penetranz ausgegangen werden (Tan et al., 2010).

Es wurden bisher 47 nicht-verwandte Fälle mit Mikroduplikationen auf 22q11.21 in der Literatur beschrieben (Ensenauer et al., 2003; Portnoï, 2009). Angesichts der begrenzten Daten kann bislang kein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Duplikationsgröße hergestellt werden (Firth, 2009).

Die Markerinformationen der SNP-Arrays innerhalb der LCR-Regionen ließen keine genaue Interpretation der Kopienzahl (s. Kapitel 3.3.1) zu. Daher stellen LCR-Regionen eine große Herausforderung bei der Eingrenzung der tatsächlichen CNV-Größe dar (Bailey et al., 2002; Locke et al., 2004; Itsara et al., 2009; Conrad et al., 2010). Die Größe des unsicheren Bereiches der duplizierten Regionen konnte mittels Array-Analyse auf einen Bereich zwischen 0,27 Mb und 0,61 Mb eingegrenzt werden (s. Tab. 15). Für die genauere Bestimmung der CNV-Grenzen werden zusätzliche molekulargenetische Techniken benötigt (Alkan et al., 2011). Daher wurden die erhobenen NGS-Daten hinsichtlich einer Eingrenzung der CNV-Bruchpunktregionen genutzt und es konnten die Unsicherheitsbereiche auf 0,02 Mb bis maximal 0,08 Mb eingegrenzt werden (s. Tab. 21).

Alle acht KBE-Patienten wurden in der maximalen Mikroduplikationsregion mittels NGS resequenziert (s. Abb. 14). So sollten potentielle Punktmutationen in den maximal 46 betroffenen Genen identifiziert werden. Die durchgeführte Analyse konnte zwar potentiell pathogene Varianten in *PRODH* und *C22orf25* detektieren, doch handelt es sich dabei wahrscheinlich um Artefakte, die aufgrund paraloger Sequenzen falsch abgeglichen wurden (Musumeci et al., 2010; Sudmant et al., 2010). Zudem wird *PRODH* mit Hyperprolinämie assoziiert und bei *C22orf25* handelt es sich um einen offenen Leserahmen („open reading frame“) ohne resultierende mRNA. Daher wurden von den elf betroffenen Genen der kleinsten gemeinsam duplizierten Region *SNAP29* und *CRKL* für eine Kandidatengenanalyse in 95 KBE-Patienten ausgewählt. Auch hier konnte keine pathogene Mutation identifiziert werden. Zum einen war die Kandidatengenauswahl sehr fokussiert und die Analyse auf 95 Patienten begrenzt. Zum anderen spiegelt dies aber auch die Forschung zu den anderen Phänotypen mit CNV-Beteiligung in der chromosomalen Region 22q11.21 wider. Es konnte bisher lediglich ein Gen (*TBX1*) mit einem der Phänotypen (VCFS/DGS) in Verbindung gebracht werden (Yagi et al., 2003; Liao et al., 2004; Paylor et al., 2006; Torres-Juan et al., 2007; Zweier et al., 2007).

Die Assoziation zwischen der Mikroduplikation 22q11.21 und KBE konnte auch durch statistische Analyse bestätigt werden, das errechnete OR betrug 28,76 ( $P = 3,891 \times 10^{-5}$ ). Die vorliegende Arbeit erweitert somit das phänotypische Spektrum des 22q11.2 Duplikationssyndroms um den Phänotyp KBE.

Die bei der Mikroduplikation 22q11.21 beobachtete phänotypische Variabilität findet sich auch bei anderen CNVs, z.B. in den chromosomalen Regionen 1q21.1, 15q13.3, 16p11.2, 17q12 (Mefford et al., 2007, 2008; Sharp et al., 2008; Weiss et al., 2008).

Unter Berücksichtigung anderer Vorbefunde, wie z. B. der Beobachtung von sechs BEEK-Patienten mit Trisomie 21 (Reutter et al., 2009), kann postuliert werden, dass dosisabhängige genetische Effekte im Allgemeinen zur Ätiologie des BEEK beitragen.

### 5.1.2 Duplikation auf Chromosom 19 und WIZ als Kandidatengen

Eine *de novo* 0,9 Mb-Mikroduplikation auf 19p13.12 konnte durch die Untersuchung von 110 BEEK-Patienten identifiziert werden (Kapitel 4.1.1.2). Die Mikroduplikationsträgerin (Patient 275-501) zeigt eine isolierte KBE, die Eltern sind gesund. Weltweit wurden bisher nur drei weitere Patienten (s. Abb. 11) mit einer Mikroduplikation in der Region beschrieben, wobei aber keiner dieser Patienten eine KBE aufwies (Thienpont et al., 2008; DECIPHER). Die proximalen Bruchpunkte von zwei dieser Duplikationen liegen in der hier beschriebenen Mikroduplikation, die dritte beobachtete Duplikation könnte eng benachbarte oder sogar identische Bruchpunkte aufweisen.

Die phänotypischen Unterschiede der vier Patienten könnten durch die Orientierung der Duplikation (in Tandem oder invertiert) oder auf eine Translokation zurückzuführen sein, was in keinem der vier Fälle analysiert wurde. Die Unterschiede könnten aber auch durch die unterschiedlichen Bruchpunkte oder durch eine variable Ausprägung ähnlich der Situation bei der Mikroduplikation 22q11.21 resultieren (Draaken et al., 2010b).

Bei unseren Patienten konnten zwei weitere heterozygote Aberrationen identifiziert werden. Zum einen handelt es sich um eine benigne maternal vererbte 1 Mb-Mikroduplikation auf 17q25.1. Unterschiedliche Studien in Kontrollpopulationen haben ebenfalls CNVs in dieser Region mit erhöhter Kopienanzahl detektiert (Pinto et al., 2007; Simon-Sanchez et al., 2007; Zogopoulos et al., 2007; Itsara et al., 2009). Zum anderen konnte eine maternal vererbte 95,5 Kb-Deletion auf 1q32.1 identifiziert werden. Diese

Aberration unterbricht *CTSE* (Cathepsin E), eine endolysosomale Aspartoprotease, vorwiegend exprimiert in Zellen des Immunsystems (Yanagawa et al., 2007), der Magenschleimhaut und der epidermalen Keratinozyten (Kawakubo et al., 2011). Allerdings führte der komplette Knockout von *Ctse* in Mäusen nur zu einer lysosomalen Speicherkrankheit im Makrophagen und zu einer erhöhten Anfälligkeit für bakterielle Infektionen (Yanagawa et al., 2007). Daher erscheint ein kausaler Zusammenhang dieses CNVs mit der Ausprägung der KBE bei dem Patienten unwahrscheinlich. Zusammenfassend kann man die zwei zusätzlich beobachteten CNVs eher als genetische Veränderungen ohne klinische Relevanz ansehen.

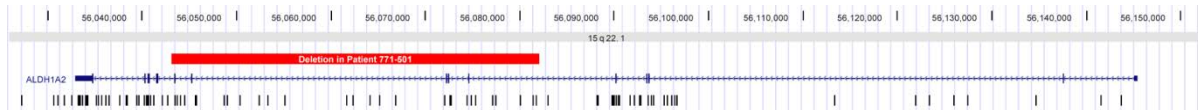
In der *de novo* Duplikation auf Chromosom 19 liegen 20 RefSeq-Gene. Die Bruchpunkte liegen im Bereich der Gene *SLC1A6* (proximal) und *CYP4F11* (distal). Obwohl beide Gene an GT 9,5 und GT 10,5 in der Maus nicht exprimiert sind, könnte ein Fusionsprotein, bestehend aus Teilen beider Gene, mit der frühen Embryogenese interferieren und hypothetisch zur KBE führen. Es stand keine RNA des Patienten zur Verfügung, um diese Hypothese zu überprüfen. Es bliebe allerdings auch dann unklar, inwieweit ein postnataler Befund die Situation während der Embryogenese wider spiegelt.

WISH-Analysen der übrigen in der Region lokalisierten Gene konnten zeigen, dass nur *Wiz* spezifisch in der kaudalen Region während der GTe 9,5 bis 13,5 exprimiert wird (s. Tab. 25). *WIZ* ist weitgehend konserviert (Baust et al., 2002) und über die Proteinfunktion ist wenig bekannt. Ein Knockout in der genomischen Region um *Wiz* konnte in einer früheren Studie mit kongenitalen Augenfehlbildungen, Polydaktylie und Otozephalie bei der Maus assoziiert werden (Kalter, 1968). *Wiz* als Transkriptionsfaktor ist sowohl in der kloakalen Membran als auch im Genitalhöcker während den entwicklungsrelevanten Stadien für die Ausbildung von BEEK exprimiert (s. Abb. 18). Daher könnte die gefundene Duplikation über eine veränderte Expression einen phänotypischen Effekt hervorrufen. Die Sequenzierung aller neun kodierenden Exons (inkl. der angrenzenden Spleißstellen) bei 110 BEEK-Patienten konnte allerdings keine pathogene Mutation identifizieren. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass Mutationen im *WIZ*-Gen eine häufige Ursache für KBE oder BEEK sind (Draaken et al., 2013).

### 5.1.3 *ALDH1A2* (CNV Analyse in acht iranischen konsanguinen Familien)

Bei der CNV-Analyse von acht konsanguinen iranischen Patienten und ihrer gesunden Eltern wurde eine Mikrodeletion auf Chromosom 15 (15q22.1) detektiert. Diese

Mikrodeletion führt zum heterozygoten Verlust der Exons 4 bis 8 (von insgesamt 13) des Gens *ALDH1A2* (s. Abb. 26).



**Abb. 26: Mikrodeletion 15q22.1 in *ALDH1A2***

Dargestellt ist mittels UCSC Genome Browser (hg18) *ALDH1A2* sowie in rot der deletierte Bereich in Patient 771-501. Dieser führt zum heterozygoten Verlust der Exons 4 bis 8 von *ALDH1A2*. Darüber ist die genomische Position und die betroffenen Chromosomenbanden aufgetragen. Die Sondenabdeckung des verwendeten SNP-Arrays (HumanOmni1-Quad von Illumina) ist für die Region im unteren Teil dargestellt.

*Aldh1a2* ist für die Synthese von Retinsäure während der frühen embryonalen Entwicklung der kaudalen Strukturen (Sakral- und Schwanzwirbel, Enddarm sowie Urogenitaltrakt) verantwortlich (Niederreither et al., 2002; Uji et al., 2011). Das ungestörte Zusammenspiel von *Aldh1a2* und *Cyp26a1* ermöglicht die posteriore Organentwicklung und verhindert im Mausmodell die Ausbildung einer Spina bifida (Niederreither et al., 2002). Mäuse mit einem hypomorphen Allel des *Aldh1a2*-Gens zeigen phänotypisch Merkmale des DiGeorge-Syndroms, wie kraniale oder tracheale Defekte und Anomalien sowie Defekte bis zur vollständigen Abwesenheit der posterioren Kiemenbögen (Vermot et al., 2003).

Die *ALDH1A2* betreffende Mikrodeletion ist im vorgestellten KBE-Patienten paternal vererbt. Um auszuschließen, dass in der konsanguinen Familie eine zweite Mutation segregiert oder es beim Patienten zu einer pathogenen Neumutation auf dem anderen Allel gekommen ist, wurden alle kodierenden 13 Exons sowie deren Spleißstellen sequenziert. Die Analyse konnte aber keine weitere Mutation detektieren. Der Beitrag der Mikrodeletion 15q22.1 zum Auftreten der KBE bleibt also zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt.

#### 5.1.4 NGS-Analyse einer konsanguinen marokkanischen Familie (TTLL3)

In der analysierten konsanguinen marokkanischen Familie (s. Abb. 15) gibt es drei Patienten mit KBE. In einer Kopplungsuntersuchung konnte zuvor eine 12,26 Mb-große Kandidatenregion auf Chromosom 3 identifiziert werden. Die darin lokalisierten 84 RefSeq-Gene wurden auf das Vorhandensein homozygoter potentiell pathogener

Mutationen bei zwei Patienten (Cousins VI.2 und VI.5) unter Verwendung von exomweiten NGS-Daten analysiert.

Es konnte in *TTLL3* ein homozygoter Austausch von C nach T identifiziert werden, der zu einem verfrühten Stopp-Codon in Exon 11 (von 13) führt. Diese Variante ist in dbSNP als nicht validierter Polymorphismus rs3208837 mit einer Frequenz von 100 % für das C-Allel gelistet. Im 1.000 Genome Projekt wurde ebenfalls nur das C-Allel beschrieben.

Über die Funktion von *TTLL3* ist nur wenig bekannt. Als erstes Protein der *TTLL*-Familie wurde *TTLL1* im Jahr 2000 charakterisiert (Trichet et al., 2000). *TTLL*-Proteine sind verantwortlich für die Modifikation der Tubuline, die den Hauptbestandteil der Mikrotubuli darstellen (Pathak et al., 2011). Eine dominant-negative Mutation in *Ttll3* verursacht nach Wloga (2009) im Wimperntierchen schwere Defizite bei der Anlagerung von Axonemen (Achsenfäden). Knockdown von *Ttll3* im Zebrafisch immobilisiert Zilien im sich entwickelnden Embryo und führt u. a. zu Phänotypen mit gewundenem Schwanz (Wloga et al., 2009). In Wirbeltierembryonen sind bewegliche Zilien erforderlich, um die Links-Rechts-Achse am Ende der Gastrulation zu regulieren (Burdine & Schier, 2000). Es gibt bei der Maus keine Expressionsdaten für die BEEK-relevanten GT (MGI). Erste Untersuchungen am MPI in Berlin konnten in der Maus eine spezifische Expression am GT 9,5 im Darm und am GT 10,5 in der Kloake nachweisen.

Das potentiell pathogene T-Allel konnte mittels Sanger-Sequenzierung in beiden Patienten im homozygoten Zustand bestätigt werden. Daraufhin wurden alle weiteren verfügbaren Familienmitglieder hinsichtlich dieser Variante genotypisiert (s. Tab. 23). Die Abb. 15 zeigt die familiäre Segregation des T-Allels. Eine phänotypisch unauffällige Schwester (VI.8) des Patienten VI.5 trägt das T-Allel ebenfalls im homozygoten Zustand. Das schließt eine Pathogenität der Variante trotzdem nicht aus, da schon die Kopplungsergebnisse auf eine (möglicherweise geschlechtsspezifisch) reduzierte Penetranz hingewiesen haben.

Bei der Genotypisierung der Variante in einem größeren Fall-Kontroll-Kollektiv (378 BEEK-Patienten, 380 Kontrollen) wurde für das T-Allel in den Patienten eine leichte erhöhte Frequenz nachgewiesen (4,63 % vs. 3,29 %, s. Tab. 24). Es wies allerdings keine der untersuchten Personen eine Homozygotie für das T-Allel auf. Auf genetischer Ebene würde sich nur durch den Nachweis von weiteren Patienten mit einem homozygoten Genotyp ein zusätzlicher Hinweis für die Pathogenität der *TTLL3*-Variante ergeben.



Angesichts der offensichtlichen Heterogenität der molekularen Ursachen der BEEK erfordert dies die Untersuchung einer sehr großen Zahl von Patienten und Kontrollen.

Da sowohl die bisher erhobenen genetischen Daten als auch die Expressionsdaten *TTLL3* als sehr vielversprechendes Kandidatengen erscheinen lassen, wird derzeit am MPI in Berlin ein Knockout-Mausmodell etabliert. Daraus lassen sich ggf. neue Erkenntnisse über die Bedeutung von *TTLL3* für die Entwicklung der Harnblase ableiten.

### 5.1.5 Kandidatengenanalyse für *CYR61*

Der nichtsteroidale Androgenrezeptorantagonist Flutamid (FLU; 2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl] propanamid) findet routinemäßige Anwendung in der Behandlung des Prostatakarzinoms. McIntyre et al. (2001) sowie Foster und Harris (2005) konnten zeigen, dass die embryonale Exposition einer Einzelgabe Flutamid in bis zu 12 % der Fälle eine E bei den exponierten Rattenembryonen hervorrufen kann. Eines der Gene, dessen Expression im Urogenitalbereich der Ratte mit am stärksten durch FLU induziert wird, ist *Cyr61* (Vo et al., 2009). Beim Menschen beeinflusst das Protein CYR61 neben Zellproliferation und -wanderung die Adhäsion von Endothelzellen und Fibroblasten. Zudem konnte gezeigt werden, dass *Cyr61* während der kritischen Entstehungszeit von E in der Maus spezifisch um die kloakale Region und den genitalen Tuberkel exprimiert ist (Draaken et al., 2010a). Dies lässt *CYR61* als ein vielversprechendes Kandidatengen erscheinen.

Es konnte jedoch sowohl in den kodierenden Regionen als auch im Bereich der Exon-Intron Übergänge des auf Chromosom 1p22.3 lokalisierten *CYR61* bei keinem der untersuchten elf Patienten mit E bzw. acht Patienten mit KBE eine pathogene Mutation identifiziert werden (Draaken et al., 2010a). Es ist daher unwahrscheinlich, dass genomische Mutationen in *CYR61* eine häufige Ursache von E und/oder KBE sind. Die untersuchten Patientenzahlen sind aufgrund der zu erwartenden ätiologischen Heterogenität von E aber zu klein, um seltene kausale Mutationsereignisse verlässlich zu identifizieren.

## 5.2 Isolierte anorektale Malformation (ARM)

Diskutiert werden in diesem Kapitel die Befunde bei Patienten mit isolierter ARM. Es werden, basierend auf den CNV-Analysen, eine Duplikation auf Chromosom 18 (Kapitel 5.2.1) und ein Patient mit Deletion-18q-Syndrom (Kapitel 5.2.2) sowie, basierend auf einer Kandidatengenstrategie, die Sequenzierungsergebnisse von ausgewählten Genen der WNT- und FGF-Signalwege (Kapitel 5.2.3) erörtert.

### 5.2.1 Duplikation auf Chromosom 18

Eine 15,1 Mb große *de novo* Duplikation 18p11.21-q12.1 konnte bei einer Patientin mit Analatresie, PDA, milden Gesichtsdysmorphien und Hypotonie bei einer CNV-Analyse von 13 Patienten mit ARM detektiert werden. Nach Sichtung der Literatur und Ausschluss von Patienten mit zusätzlichen chromosomalen Aberrationen oder komplexen Rearrangements von Chromosom 18 (Marical et al., 2007; Rodríguez et al., 2007) fanden sich nur drei weitere Patienten (s. Tab. 28) mit Duplikationen des Chromosoms 18 und einer Überlappung der betroffenen Regionen (Jaffray et al., 1980; Turleau et al., 1980; Wilson et al., 1990). Alle drei in der Literatur berichteten Patienten haben, im Gegensatz zu dem hier vorgestellten Fall, viele übereinstimmende Symptome mit dem Symptomspektrum einer kompletten Trisomie 18.

Tab. 28: Übersicht von Patienten mit Trisomie 18pter→q12 modifiziert nach Schramm et al. 2011

	Chromosomale Region	Max. Größe (Mb)
<b>Hier vorgestellter Patient (351-501)</b>	18p11.21-q12.1	15,1
Jaffray et al., 1980	18pter → q12.2	35,5
Turleau et al., 1980	18pter → q12.2	35,5
Wilson et al., 1990	18pter → q12	41,8

Ungefähr 15 % der Patienten mit kompletter Trisomie 18 zeigen eine ARM (Kosho et al., 2006; Lin et al., 2006). Die hier beschriebene Region umfasst 52 Gene. Der vorgestellte Fall ist der erste publizierte Patient mit ARM und einer partialen *de novo* Trisomie 18 (18p11.21-q12.1; Schramm et al., 2011).

### 5.2.2 Deletion-18q-Syndrom

Bei einem ARM Patient mit zusätzlichen Symptomen eines 18q-Syndroms (De-Grouchy Syndrom) konnte eine *de novo* 12,2 Mb-Deletion (18q22.3-qter) und eine *de novo*

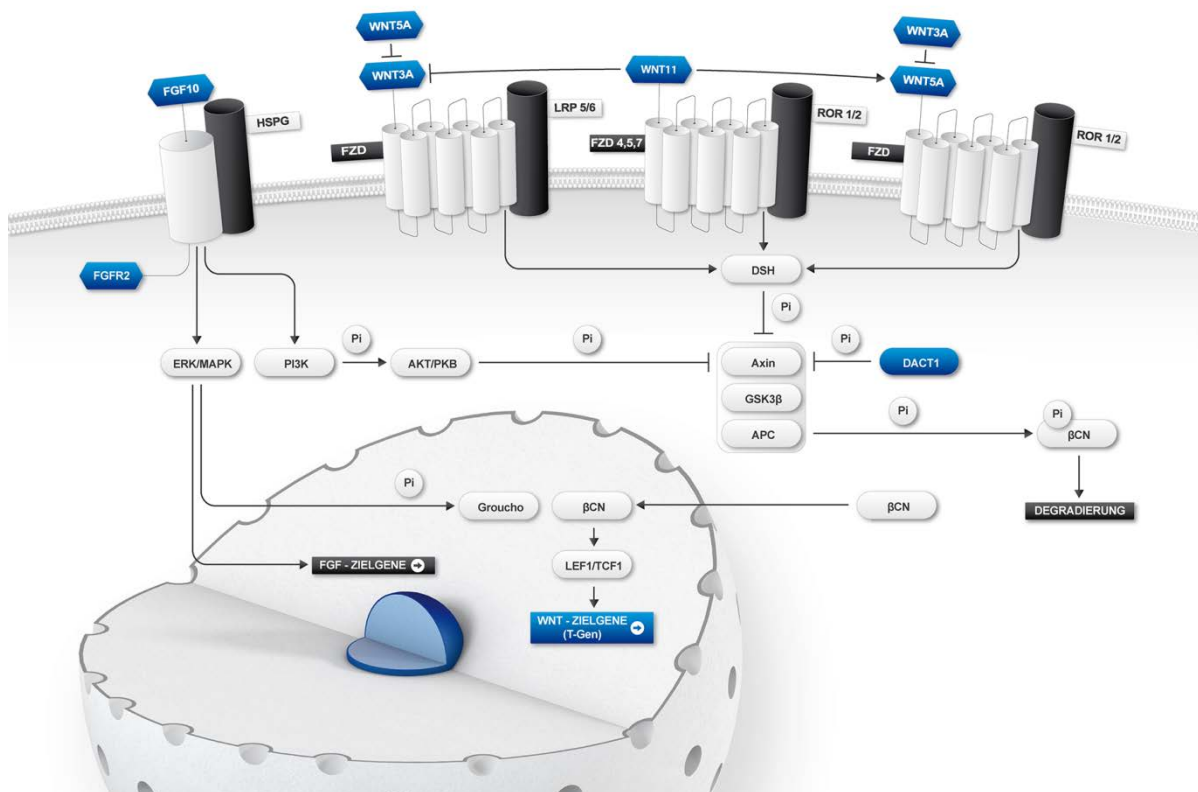
2,2 Mb-Duplikation (18pter-p11.32), lokalisiert am telomeren Ende von Chromosom 18q, identifiziert werden.

Erst 16 weitere Patienten, alle ohne ARM, wurden bisher mit einem dup18p/del18q Chromosom in der Literatur beschrieben (Vianna-Morgante et al., 1976; Teyssier & Bajolle, 1980; Mejía-Baltodano et al., 1997; Roberts et al., 2001; Vermeulen et al., 2005; Feenstra et al., 2007; Heard et al., 2009; O'Donnell et al., 2010). Für die Entstehung der Aberrationen wird ein crossing over innerhalb der invertierten Region auf Chromosom 18 während der Meiose vermutet (Anton et al., 2005). Eine gründliche Sichtung der Literatur und Expressionsdatenbanken bzgl. der 43 betroffenen Gene ließ keinen Schluss auf ein erfolgversprechendes Kandidatengen zu (Bartels et al., 2011). Trotzdem unterstützt dieser Bericht eines ersten Patienten mit dem Deletion-18q-Syndrom und ARM die mögliche Bedeutung von auf Chromosom 18 lokalisierten Genen bei der Entstehung von ARM (Bartels et al., 2011).

### 5.2.3 Ausgewählte Kandidatengene der WNT- und FGF-Signalwege

WNT-/FGF-Signalwege regulieren die Zell-Spezifikation und die Gewebedifferenzierung während der Embryogenese (Dorey & Amaya, 2010; Pownall & Isaacs, 2010). Eine Störung dieses koordinierten Zusammenspiels kann zu uro-rektalen Fehlbildungen bei Mäusen und Menschen führen (Wilkie, 2005; Shifley & Cole, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf der Grundlage der Beobachtungen bei Mäusen und humanen Zelllinien und/oder ihrer Beteiligung an syndromalen ARM-Formen Kandidaten-Gene aus diesen Signalwegen ausgewählt und analysiert (s. Abb. 27).

In der untersuchten Kohorte von 78 ARM Patienten wurden allerdings keine potentiell pathogenen Varianten in den Genen *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT11*, *DACT1*, *FGF10* und *T-Gen* detektiert (Draaken et al., 2012). Die Analyse von *FGFR2* ergab in drei Patienten jeweils bisher nicht beschriebene Varianten in heterozygoter Situation.



**Abb. 27: Abstrahierte Darstellung von Signaltransduktionen ausgewählter FGF-/WNT-Proteine nach Draaken et al. (2012)**

Dargestellt sind molekulare FGF/WNT Signaltransduktionswege ausgewählter Kandidatenproteine für ARM. Die Formation des FGF:FGFR:HSPG Signalkomplexes aktiviert ERK/MAPK sowie PI3K. PI3K aktiviert wiederum AKT/PKB mit anschließender Inhibition des Proteinkomplexes Axin/APC/GSK3β. ERK/MAPK fördert die Transkription von FGF-Zielgenen und könnte zudem die Freisetzung des transkriptionalen Repressors Groucho von TCF1 begünstigen.

Dies wiederum führt zur Interaktion zwischen LEF1/TCF1 und βCN und aktiviert die Transkription von WNT-abhängigen Genen, wie z. B. dem T-Gen. Bei Abwesenheit von βCN im Zellkern wirkt LEF1/TCF1 als transkriptionaler Repressor durch die Bindung an Groucho. βCN kann wiederum Groucho von TCF1/LEF1 lösen. WNT3A und WNT5A und WNT11 binden an die FZD-Rezeptorfamilie zusammen mit LRP5/6 oder ROR1/2 und aktivieren DSH. DSH, wie auch DACT1, inhibiert den Proteinkomplex Axin/APC/GSK3β und führt zu einer Erhöhung von βCN im Zellkern und Zytoplasma. Die Abwesenheit dieses Effektes führt zur Phosphorylierung von βCN durch den Proteinkomplex Axin/APC/GSK3β und fördert den Abbau von βCN. Die Abbildung wurde adaptiert von vorherigen Studien (Catala, 2002; Grumolato et al., 2010; Pownall & Isaacs, 2010; Uysal-Onganer & Kypta, 2012).

AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, APC: adenomatous polyposis coli, ARM: anorektale Malformationen, βCN: β-catenin, DACT1: dapper homolog 1, DSH: dishevelled, ERK: extra-cellular signal-regulated kinase, FGF: fibroblast growth factor, FZD: Frizzeld, GSK3β: glycogen synthase kinase 3β, HSPG: heparan sulfate proteoglycan, LEF1: lymphoid enhancer-binding factor 1, LRP: low density lipoprotein receptor-related protein, MAPK: mitogen-activated protein kinases, PI3K: phosphoinositide-3 kinase, PKB: protein kinase B, ROR: receptor tyrosine kinase-like orphan receptor, TCF1: trancription factor 1, WNT: wingless-type MMTV integration site family.

Eine der drei FGFR2-Varianten ist eine in Exon 18 gelegene synonyme Variante (c.C2717T, p.Phe689=). Da die Variante höchstwahrscheinlich keine biologische Auswirkung hat, wurde sie nicht weiterverfolgt. Die zwei anderen Varianten (p.Ala461Val und p.Thr454=) sind in Exon 12 lokalisiert. Diese würden den zytoplasmatischen Teil des Proteins betreffen, der bisher nicht mit den durch

Mutationen in *FGFR2* verursachten Formen des autosomal-dominanten Kraniosynostose-Syndromes in Verbindung gebracht wurde (Ohashi et al., 1993; LeHeup et al., 1995; Park et al., 1995a, 1995b; Pfeiffer et al., 1996; Przylepa et al., 1996; Krepelová et al., 1998; Schaefer et al., 1998; Kodaka et al., 2004).

Patient G10 (p.Ala461Val) zeigt eine ARM, eine Hypoplasie des linken Daumens, eine preaxiale Polydaktylie der linken Hand, einen Keilwirbel (Brust und Hals), Missbildungen der Rippen, dextroversio cordis und eine linksseitige Doppelniere und somit das Vollbild einer Vater/VACTERL-Assoziation. p.Ala461Val wurde vom Programm MutationTaster (Schwarz et al., 2010) als krankheitsverursachend eingeordnet. Allerdings beurteilen die bioinformatischen Analyseprogramme PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010), MutPred (Li et al., 2009) und SNPs & Go (Calabrese et al., 2009) diese Substitution als benigne Variante.

Patient B10 (p.Thr454=) weist zwar eine synonyme Variante auf, das in der Familie beobachtete Phänotypspektrum ließ aber eine weitere Abklärung sinnvoll erscheinen. Der betreffende Patient weist neben einer ARM auch eine Hypospadie, eine linksseitige Nierenagenesie, Missbildungen der Rippen, Lendendefekte, Spina bifida occulta und eine Hexadaktylie des rechten Fußes auf. Die Variante ist maternal vererbt und interessanterweise zeigen sowohl der Patient als auch seine Mutter eine Spina bifida occulta. Die Variante (p.Thr454=) liegt innerhalb eines für den Spleißvorgang verantwortlichen Sequenzmotives und könnte ein alternatives Spleißen auslösen. Die Ergebnisse der daraufhin durchgeführten mRNA-Experimente deuten aber darauf hin, dass die Variante keinen Einfluss auf den Spleißvorgang hat und es sich somit vermutlich um eine benigne Variante handelt.

Zusammenfassend konnte kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen ARM und genetischer Variation in *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT11*, *DACT1*, *FGF10*, *FGFR2* oder dem *T-Gen* dargestellt werden, obwohl diese Gene in direktem Zusammenhang mit der uro-rektalen Entwicklung gebracht wurden (Ohashi et al., 1993; LeHeup et al., 1995; Yamaguchi et al., 1999; Lickert et al., 2001; Cheyette et al., 2002; Fairbanks et al., 2004; Yucel et al., 2004; Nakata et al., 2009; Tai et al., 2009; Wen et al., 2010; Mehta et al., 2011; Spence et al., 2011; van de Ven et al., 2011). Das untersuchte Patientenkollektiv war zwar größer als in früheren Kandidatengenstudien zur ARM (Papapetrou et al., 1999; Seri et al., 1999; Krüger et al., 2008b; Agochukwu et al., 2011), trotzdem hatte die Stichprobengröße

immer noch eine begrenzte Power zur Detektion seltener kausaler Mutationen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Mutationen in der Promotorregion, in noch unbekannten regulatorischen Sequenzen bzw. in nicht kodierenden Regionen (die mit den angewandten Verfahren nicht nachweisbar sind), übersehen wurden. Auch könnte es sich bei den gefundenen Varianten in *FGFR2* möglicherweise doch um pathogene Mutationen handeln. Daher würden sich eine Untersuchung in einem größeren Patientenkollektiv sowie die Überprüfung im Mausmodell anbieten. Zukünftige Studien sollten zusätzliche Proteine der WNT-/FGF-Signalwege als mögliche Kandidaten analysieren, um einen genetischen Zusammenhang dieser Signalwege mit der uro-rektalen Entwicklung beim Menschen herstellen zu können.

### 5.3 VATER/VACTERL-Assoziation

Es wurden 47 Patienten mit VATER/VACTERL bzw. mit VATER/VACTERL-ähnlichem Phänotyp zusammen mit ihren phänotypisch gesunden Eltern mittels SNP-Array molekulargenetisch karyotypisiert. Drei *de novo* Mikroduplikationen in den chromosomalen Regionen 1q41, 2q37.3 und 8q24.3 konnten in drei unterschiedlichen Familien detektiert werden. Diese CNVs betreffen die Gene *SPATA17*, *CAPN10*, *GPR35*, *EPPK1*, *PLEC* und *PARP10*.

Die Expression von *Spata17* ist in verschiedenen Spezies auf den Hoden beschränkt (Deng et al., 2006; Nie et al., 2011) und wurde daher nicht weiter untersucht. Ebenfalls wurde das moderat bis ubiquitär an GT 14,5 exprimierte Gen *Capn10* ausgeschlossen. Ein Knockout von *Capn10* führt im Tiermodell zu einem Anstieg von Adipositas und metabolischen Defekten (Cheverud et al., 2010). Die Expression von *Plec* ist auf die Netzhautentwicklung nach GT 14,0 beschränkt. Es scheint aber auch in anderen Geweben exprimiert zu werden, da die Mausembryonen neonatal mit Blasenbildung und weiteren Defekten der Haut sterben (Andrä et al., 1997). Mutationen in *PLEC* sind beim Menschen mit einem Subtyp der Epidermolysis bullosa assoziiert (Pfendner et al., 2005). Für *Parp10* konnten keine Expressionsdaten gefunden werden. Das Gen teilt sich aber einige Exons mit *Plec* und gezielte Deletionen beeinträchtigen das Nervensystem (Fuchs et al., 2009).

Die vielversprechendsten Kandidatengene sind *GPR35* und *EPPK1*. WISH-Analysen konnten für GT 12,5 und 14,5 die Expression von *Gpr35* und *Eppk1* u. a. im für

VATER/VACTERL-relevanten Gewebe validieren (s. Abb. 23). Dies entspricht den menschlichen Schwangerschaftswochen sechs bis acht und umfasst die relevanten Stadien der Organsystementwicklung bei Mäusen, die bei der Entstehung der VATER/VACTERL-Assoziation beteiligt sind (O’Rahilly, 1979).

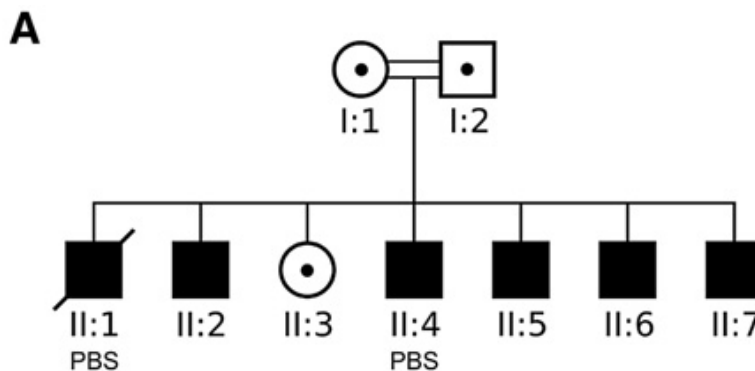
*Gpr35* ist zudem im Genitalhöcker und in den Spinalganglien exprimiert. Dies sind keine Gewebe, die nach Definition der VATER/VACTERL-Assoziation direkt betroffen sind, doch weist interessanterweise ein erheblicher Anteil der Patienten zusätzliche genitale Anomalien oder Defekte auf (Czeizel & Ludányi, 1985). Die Neuronen der Spinalganglien sind eng mit der Entwicklung der Wirbelkörper verbunden und entstammen den Neuralleistenzellen. Diese sind bei der Bildung der für die VATER/VACTERL-Assoziation relevanten Gewebe, einschließlich des kardialen Ausflusstrakts und des enterischen Nervensystems, beteiligt. Auf Grundlage dieses Zusammenhangs und den Expressionsdaten wurde *GPR35* als Kandidatengen für die VATER/VACTERL-Assoziation priorisiert.

Die Analyse der proteinkodierenden Exons von *GPR35* in 192 Patienten mit VATER/VACTERL-Assoziation bzw. VATER/VACTERL-ähnlichem Phänotyp konnte keine Mutation detektieren. *GPR35* kann aber als kausales Gen nicht ausgeschlossen werden, da Mutationen in *GPR35* vielleicht nur eine seltene Ursache der VATER/VACTERL-Assoziation sind und die untersuchte Kohorte zu klein gewesen ist. Es könnten allerdings auch Mutationen in den nichtkodierenden Exons oder in anderen, das Gen regulierenden Elementen für die VATER/VACTERL-Assoziation verantwortlich sein. Letztlich bleibt *GPR35* weiterhin ein vielversprechendes Kandidatengen und sollte in zusätzlichen genetischen und funktionellen Studien untersucht werden. In weiterführenden Analysen sollten zudem die anderen fünf Gene (*EPPK1*, *SPATA17*, *CAPN10*, *PLEC* oder *PARP10*), die in den detektierten *de novo* Mikroduplikationen kartieren, untersucht werden.

## 5.4 Prune-Belly-Syndrom (PBS)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in fünf Brüdern mit einem PBS-ähnlichem Syndrom eine homozygote Mutation (p.Pro392Alafs\*43) in *CHRM3* identifiziert werden, die zu einem Funktionsverlust führt (Weber et al., 2011). *Chrm3* kodiert einen der

muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR). und CHRM3 ist bei der Induzierung der Harnblasenkontraktion während der Miktion beteiligt (Fowler et al., 2008). Alle Nachkommen dieser konsanguinen türkischen Familie haben eine kongenitale Obstruktion des Blasenabgangs (s. Abb. 28). Der Indexpatient (II-4) sowie ein verstorbener Bruder (II-1) haben PBS, während drei Brüder (II-2, II-5, II-6) posteriore Urethralklappen (PUK) und ein vierter Bruder (II-7) eine malformierte Blase haben.



**Abb. 28: Stammbaum der konsanguinen Familie mit dem PBS-Indexpatienten**

Dargestellt sind die Eltern (I) mit ihren sieben Nachkommen (II). Alle männlichen Nachkommen haben eine kongenitale Obstruktion des Blasenabgangs. Der Indexpatient (II:4) und ein verstorbener Bruder (II:1) zusätzlich PBS. **Kreis:** weiblich; **Kasten:** männlich; **Querbalken:** verstorben; **gefüllte Fläche:** betroffene Familienmitglieder; **Punkt:** Anlageträger

Weitere *CHRM3*-Mutationen oder homozygote Deletionen konnten mittels Sanger-Sequenzierung in 19 PBS-Patienten, fünf weiteren Multiplex-PUK-Familien und 38 PUK-Patienten nicht detektiert werden.

Bemerkenswerterweise wurde kürzlich ein Erwachsener mit Miktionsfehler beschrieben (Pomper et al., 2011). Dieser hat einen auffallend ähnlichen Phänotyp wie die hier untersuchten Patienten. Bei diesem Patienten konnte im Blasengewebe kein *CHRM3*-Protein detektiert werden und es wurde eine *CHRM3*-Mutation postuliert. Jedoch waren in diesem Fall sowohl Sequenzierungs- als auch Kopienanzahl-Analysen unauffällig (Pomper et al., 2011).

Ein Ausfall der Blasenkontraktilität vor der Geburt beim Menschen mit homozygoter (oder compound heterozygoter) *CHRM3*-Mutation könnte zu der beobachteten Blasendysmorphologie postpartum beitragen. In Folge von *CHRM3*-Mutationen kommt es vermutlich zeitlebens zu Blasenfunktionsstörungen, die einen bedeutenden Risikofaktor für die Progression einer Niereninsuffizienz darstellen (Farrugia & Woolf,



2010). *Chrm3* mutierte Mäusen zeigen zusätzlich einen eingeschränkten Speichelfluss und erweiterte Pupillen. Dies steht im Einklang mit der beschriebenen Rolle der mAChR in der serösen Speicheldrüsenbildung und der Pupillenverengung bei Mäusen (Matsui et al., 2000) und konnte ebenfalls beim Menschen beobachtet werden (Pomper et al., 2011; Lin et al., 2012). Beim Indexpatienten konnte ebenfalls eine eingeschränkte Pupillenverengung diagnostiziert werden. Diese Beobachtung scheint eine mAChR-Mutation mit einer Entwicklungsstörung der Harnwege als eine Komponente des parasympathischen Nervensystems zu verbinden.

Die Blase dient als Urinreservoir und gibt diesen über den Harnleiter ab. Letzteres wird durch die Detrusorkontraktionen, stimuliert durch parasympathische Nerven, angetrieben. In der adulten humanen Blase sind zwei mAChR-Subtypen (CHRM2 und CHRM3) exprimiert (Mansfield et al., 2007; Shakirova et al., 2010), aber der kritische Rezeptor für die Miktion ist nur CHRM3 (Fowler et al., 2008). Dieser vermittelt 95 % der cholinergen Kontraktion des Detrusors (Matsui et al., 2000). In Mäusen und Ratten konnte die Expression von *Chrm3* im Blasengewebe sowohl bei Jungtieren als auch bei erwachsenen Tieren nachgewiesen werden (Schneider et al., 2005; Zarghooni et al., 2007).

Sowohl die offensichtliche loss-of-function Natur der *CHRM3*-Mutation als auch die phänotypische Ähnlichkeit zwischen den Patienten und *Chrm3*-Knockout-Mäusen unterstreichen die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um die kausale Mutation in der untersuchten Familie handelt (Weber et al., 2011). Die p.Pro392Alafs\*43 Mutation bewirkt ein vorzeitiges Stopp-Codon an Position 435. Falls mutierte RNA-Transkripte stabil wären, würde ein trunkiertes CHRM3-Protein gebildet, bei dem ein Teil der dritten Schleife der zytosolischen, transmembranen Domänen VI und VII sowie der C-Terminus des Rezeptors fehlen. Die Prognose der dreidimensionalen Struktur der CHRM3-Mutante sagt zudem eine Störung der Faltung der verbleibenden dritten intrazellulären Schleife voraus (s. Abb. 25), die bedeutend für die Signaltransduktion durch die G-Protein-Aktivierung und Interaktion ist (Borrito-Escuela et al., 2010).

## 6 Zusammenfassung

Im Fokus der hier vorgestellten Untersuchungen standen die genetischen Ursachen schwerster Formen angeborener uro-rektaler Fehlbildungen. Dazu zählt zum einen der Blasenektrophie-Epispadie-Komplex (BEEK), der klinisch hinsichtlich seines Schweregrades in drei verschiedene Subtypen unterteilt wird: Epispadie (E), klassische Blasenektrophie (KBE) und Kloakenektrophie (KE). Zum anderen handelt es sich um anorektale Malformationen (ARM) und die hier ebenfalls untersuchten syndromalen ARM-Formen, wie die VATER/VACTERL-Assoziation und das Prune-Belly-Syndrom (PBS). In Deutschland werden jährlich geschätzt 280 Patienten (Inzidenz 1 : 2.500) mit diesen Fehlbildungen geboren (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, 1987; Jenetzky, 2007).

Es wurden Kandidatengene und -regionen für BEEK und ARM identifiziert und weiter analysiert. Bei diesen Untersuchungen wurde der Schwerpunkt auf den Nachweis von Kopienzahlveränderungen (CNVs) gelegt, die als DNA-Segmente unabhängig von Größe und Frequenz mit abweichender Kopienanzahl im Vergleich zu einem Referenzgenom definiert sind. Hier lag der Fokus auf der Identifizierung von *de novo* CNVs, die kodierende Gensequenzen involvieren. Zusätzlich wurden Sanger-Sequenzierungen und NGS- Analysen zur Untersuchung von in Kopplungs- und CNV-Regionen gelegenen Kandidatengenen durchgeführt. Ebenfalls mit Sanger-Sequenzierung wurden Kandidatengene untersucht, die aufgrund systematischer Literaturrecherchen und basierend auf den Expressionsanalysen im Mausembryo (durchgeführt am Max-Planck-Institut in Berlin) ausgewählt wurden.

Nach einem ersten Mikroduplikationsbefund auf Chromosom 22q11.21 wurde eine region-spezifische CNV-Analyse in 348 BEEK-Patienten und 1217 Kontrollen durchgeführt. Dabei wurden insgesamt sechs KBE-Patienten mit Duplikationen auf Chromosom 22q11.21 identifiziert (Draaken et al., 2010b). Für weitere Analysen wurden zwei von einer unabhängigen Arbeitsgruppe berichtete KBE-Patienten mit CNVs in dieser Region (Lundin et al., 2010) einbezogen. Die Analyse der Bruchpunktregionen und potentieller Kandidatengene (*SNAP29* und *CRKL*) konnte die molekularen Ursachen allerdings nicht weiter spezifizieren. Träger einer Mikroduplikation 22q11.21 haben gegenüber Nichtträgern ein mehr als 28-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer KBE (OR 28,76;  $P = 3,891 \times 10^{-5}$ ). Der Zusammenhang ist damit sicher nachgewiesen, so

dass das phänotypische Spektrum des die Region 22q11.21 betreffenden Duplikationssyndroms Chromosom 22 um den bisher nicht beschriebenen Phänotyp KBE erweitert werden muss. Weitergehende Untersuchungen werden die Isolierung der Beiträge einzelner Gene zum Ziel haben.

Die genomweite CNV-Analyse von 110 BEEK-Patienten identifizierte bei einem KBE-Patienten eine *de novo* 0,9 Mb Mikroduplikation auf Chromosom 19p13.12. Auf der Basis von Expressionsuntersuchungen wurde aus den in der Region lokalisierten 20 RefSeq-Genen *WIZ* als Kandidatengen favorisiert. Eine Mutation in *WIZ* konnte bei 110 untersuchten BEEK-Patienten jedoch nicht nachgewiesen werden. Der Zusammenhang von Mikroduplikation und KBE bleibt damit im Moment auf den Einzelfall beschränkt (Draaken et al., 2013).

Eine CNV-Analyse bei acht konsanguinen iranischen KBE-Patienten identifizierte bei einem Patienten eine paternal vererbte Mikrodeletion auf Chromosom 15q22.1. Diese Mikrodeletion führt zum heterozygoten Verlust der Exons 4 bis 8 des *ALDH1A2*-Gens. Eine Sanger-Sequenzierung konnte zwar keine zweite pathogene Mutation auf dem trans-Allel identifizieren, *ALDH1A2* bleibt aber weiterhin ein vielversprechendes Kandidatengen, da das kodierte Protein für die Synthese von Retinsäure während der frühen embryonalen Entwicklung der kaudalen Strukturen (u. a. Urogenitaltrakt) verantwortlich ist (Niederreither et al., 2002; Uji et al., 2011).

In einer Kopplungsuntersuchung einer konsanguinen marokkanischen Familie konnte eine 12,26 Mb große Kandidatenregion auf Chromosom 3 identifiziert werden. Die hier betroffenen 84 RefSeq-Gene wurden mittels NGS-Analyse hinsichtlich einer homozygoten Variante in zwei KBE-Patienten der Kopplungsfamilie untersucht. Es wurde ein homozygoter Austausch von C nach T identifiziert, der zu einem verfrühten Stopp-Codon in Exon 11 des Gens *TTLL3* führt. Diese potentiell pathogene Variante wird in dbSNP als nicht validierter Polymorphismus rs3208837 mit einer Frequenz von 100 % für das C-Allel gelistet. Eine phänotypisch unauffällige Schwester trägt das T-Allel jedoch ebenfalls im homozygoten Zustand. Das schließt eine Pathogenität der Variante trotzdem nicht aus, da schon die Kopplungsergebnisse auf eine (möglicherweise geschlechtsspezifisch) reduzierte Penetranz hingewiesen haben. Die Genotypisierung der Variante in 378 Patienten und 380 Kontrollen zeigte keinen signifikanten Frequenzunterschied und somit keinen Hinweis auf eine funktionelle Relevanz, so dass

dieser Befund nicht weiter verfolgt wurde. Eine systematische Literaturrecherche wies *CYR61*, das bei Proliferation, Migration und Adhäsion von Endothelzellen und Fibroblasten (Lau & Nathans, 1985; Kireeva et al., 1996) eine Rolle spielt, als potentiell Kandidatengenen für E aus. *Cyr61* wird in der Maus spezifisch um die kloakale Region und den genitalen Tuberkel exprimiert (Draaken et al., 2010a). Sowohl in den kodierenden Regionen als auch in den Exon-Intron Grenzen von *CYR61* konnte jedoch bei keinem der untersuchten elf E-Patienten sowie weiteren acht KBE-Patienten eine pathogene Mutation identifiziert werden (Draaken et al., 2010a). Aufgrund der begrenzten Kollektivgröße können Mutationen in *CYR61* nur als häufige nicht aber als seltene Ursache ausgeschlossen werden.

Die systematische CNV-Analyse von 13 ARM-Patienten und deren gesunden Eltern zeigte eine 15,1 Mb große *de novo* Duplikation 18p11.21-q12.1 bei einer Patientin mit Analatresie, PDA, leichter Gesichtsdysmorphie und Hypotonie. Eine weitere CNV-Analyse wurde bei einem ARM-Patienten aufgrund der zusätzlichen Symptome des 18q-Syndroms (De-Grouchy Syndrom) durchgeführt. Hier konnte eine *de novo* 12,2 Mb Deletion (18q22.3-qter) sowie eine *de novo* 2,2 Mb Duplikation (18pter-p11.32) detektiert werden. Die bisher bekannte Assoziation einer kompletten Trisomie 18 mit ARM in 15 % der Fälle (Kosho et al., 2006; Lin et al., 2006) sowie die hier erhobenen Befunde deuten auf einen für die anorektale Entwicklung relevanten Locus auf Chromosom 18 hin und lassen weitergehende Untersuchungen sinnvoll erscheinen (Bartels et al., 2011; Schramm et al., 2011).

Basierend auf den Beobachtungen bei Mäusen, humanen Zelllinien und/oder ihrer Beteiligung bei Erkrankungen mit ARM wurden Kandidaten-Gene aus dem WNT- und FGF-Signalweg ausgewählt und analysiert. Eine Störung der WNT-/FGF-Signalwege kann zu schweren Missbildungen bei Mäusen und Menschen im Urogenitalbereich und Anorektum führen (Wilkie, 2005; Shifley & Cole, 2007). In den Genen *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT11*, *DACT1*, *FGF10* und dem *T-Gen* wurde in der untersuchten Kohorte von 78 ARM-Patienten keine potentiell kausalen Varianten detektiert. Drei gefundene Varianten in *FGFR2* scheinen ebenfalls keinen unmittelbaren Einfluss auf die Ätiologie des ARM-Phänotyps zu haben (Draaken et al., 2012).

Eine CNV-Analyse von 47 Patienten mit VATER/VACTERL bzw. mit VATER/VACTERL-ähnlichem Phänotyp und ihren gesunden Eltern identifizierte *de novo* Mikroduplikationen in den chromosomalen Regionen 1q41, 2q37.3 und 8q24.3 in drei

unterschiedlichen Familien. Diese CNVs betreffen die Gene *SPATA17*, *CAPN10*, *GPR35*, *EPPK1*, *PLEC* und *PARP10*. Auf Grundlage von Expressionsdaten und Literaturbefunden wurde *GPR35* als Kandidatengen für die VATER/VACTERL-Assoziation priorisiert. Die Analyse der proteinkodierenden Exons von *GPR35* in 192 Patienten mit VATER/VACTERL-Assoziation bzw. VATER/VACTERL-ähnlichem Phänotyp konnte allerdings keine ursächliche Mutation detektieren (Hilger et al., in Druck).

Bei einem PBS-Patienten wurde eine homozygote Mutation (p.Pro392Alafs\*43), die ein vorzeitiges Stopp-Codon an Position 435 von *CHRM3* bewirkt, mittels NGS-Analyse gefunden und bei allen fünf Betroffenen dieser Familie bestätigt. Sowohl der offensichtliche Funktionsverlust dieser *CHRM3*-Mutante als auch die phänotypische Ähnlichkeit der Symptome zwischen den Patienten und *Chrm3*-Knockout-Mäusen unterstreichen die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um die kausale Mutation in der untersuchten Familie handelt. Weitere *CHRM3*-Mutationen oder homozygote Deletionen konnten mittels Sanger-Sequenzierung in 62 weiteren Patienten nicht detektiert werden. Somit scheinen weitere, bisher unbekannte genetische Faktoren in der Ätiologie von PBS eine Rolle zu spielen (Weber et al., 2011).

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnten bei einer Reihe von Patienten mit uro-rektalen Fehlbildungen ursächliche genetische Aberrationen identifiziert werden. Angesichts der Tatsache, dass bislang bei den untersuchten Phänotypen nur in ganz wenigen Einzelfällen genetische Ursachen berichtet waren, stellen die Ergebnisse einen erheblichen Fortschritt dar. So konnte u. a. zum ersten Mal ein chromosomaler Locus (Chromosom 22q11.21) als ursächlich für die Entwicklung einer BEEK identifiziert werden. Weiterhin scheint Chromosom 18 einen Einfluss auf die Ätiologie von ARM zu haben (Bartels et al., 2011; Schramm et al., 2011) und für PBS konnte *CHRM3* in einem familiären Fall als pathogenes Gen identifiziert werden (Weber et al., 2011). Weitere Kandidatengene und -regionen wurden vorgeschlagen und bedürfen der weitergehenden Abklärung.

## 7 Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, seltene hochpenetrante Kandidatenregionen und -gene für den BEEK und für ARM zu identifizieren. Dafür wurden u. a. genomweite Genotypisierungsdaten erhoben. Diese Daten lassen sich für weiterführende Analysen neu analysieren und auswerten. In der vorliegenden Arbeit wurde QuantiSNP zur CNV-Detektion herangezogen. Der bereits generierte Datensatz wird mit weniger stringenten Filterkriterien erneut evaluiert, um ggf. nicht detektierte ursächliche CNVs in den bereits untersuchten Patienten doch noch zu identifizieren. Zudem wurden in den vergangenen Jahren neben QuantiSNP weitere Algorithmen zur Detektion von CNVs publiziert (Sun et al., 2009; Coin et al., 2010) und sollen ebenfalls angewendet werden.

Ein weiterer Fokus wird sich den regulatorischen Elementen im menschlichen Genom widmen. Das ENCODE-Projekt (ENCODE Project Consortium, 2004) konnte kürzlich ca. 80 % des menschlichen Genoms biochemische Funktionen zuweisen (Dunham et al., 2012). Daher werden diese Daten für eine weiterführende CNV-Analyse etabliert und zudem CNVs gezielt analysiert, die bis zu 1 Mb von Genen entfernt liegen. Solche CNVs betreffen häufig regulatorische Elemente und können die Expression von Genen beeinflussen (Klopocki & Mundlos, 2011).

Der in dieser Arbeit erfolgreich gewählte CNV-Ansatz soll darüber hinaus an zusätzlichen Patienten durchgeführt werden, um den Beitrag an ursächlichen CNVs zur Entstehung uro-rektaler Malformationen systematisch weiter zu untersuchen.

Eine Vergrößerung der Kollektive wird darüber hinaus Analysen ermöglichen, die wegen der begrenzten Stichprobengröße bisher nicht möglich waren. So ist als nächster Schritt geplant, weitere 200 BEEK-Patienten genomweit zu genotypisieren, um eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) durchzuführen. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Mehrzahl der BEEK-Patienten ein genetisch komplexer Erbgang zugrunde liegt. Daher ist eine GWAS zur Identifizierung niedrig penetranter Suszeptibilitätsgene geplant. Hierfür werden die neu generierten, zusammen mit den bereits erhobenen, genomweiten Genotypisierungsdaten verwendet. Eine Powerkalkulation für ARM und BEEK prognostiziert Erfolgsaussichten für einen GWAS-Ansatz von über 80 % bei Einschluss von 300 Patienten. Für die Kalkulation wurden die Ergebnisse der am Institut für Humangenetik in Bonn erfolgreich durchgeführten GWAS

für Lippen-Kiefer-Gaumenspalte herangezogen (Birnbaum et al., 2009; Mangold et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Exomsequenzierung eine pathogene Mutation in einem familiären Fall von PBS identifizieren (Weber et al., 2011). Basierend auf der Erfahrung dieser Arbeit werden NGS-Analysen bei Patienten ohne auffälligen CNV-Befund durchgeführt. Es ist geplant, zwei weitere Multiplex-Familien und acht konsanguine BEEK-Patienten exomweit zu sequenzieren, um mögliche autosomal-rezessive Krankheitsgene bei diesen Familien zu identifizieren. Zudem ist eine NGS-Analyse von zehn KE-Trios zur Identifizierung hochpenetranter, autosomal-dominanter *de novo* Mutationen geplant. Dieser Ansatz basiert auf der fehlenden Reproduktionsfähigkeit der meisten KE-Patienten. Der direkte Vergleich der elterlichen Exome mit denen der jeweiligen Kinder kann die Anzahl potentiell ursächlicher *de novo* Mutationen auf bis zu fünf Varianten reduzieren (Vissers et al., 2010) und stellt somit eine vielversprechende Methode zur Identifizierung pathogener *de novo* Mutationen dar.

Die Ergebnisse der geplanten Forschungsarbeiten werden zu einem besseren Verständnis der molekulargenetischen Grundlagen normaler und gestörter embryonaler Entwicklung des menschlichen Urogenitaltraktes und des Enddarmes führen. Die Identifizierung betroffener Proteine wird Ausgangspunkt für die Erstellung von Signalketten liefern, deren Störung zur Ausprägung der untersuchten Malformationen beiträgt und die Generierung neuer Maus- oder Zebrafisch-Modelle ermöglichen. Perspektivisch wird die Identifizierung hochpenetranter ursächlicher Mutationen neue diagnostische Möglichkeiten eröffnen und eine genaue Einschätzung des Wiederholungsrisikos für betroffene Familien erlauben.

## Literaturverzeichnis

- Aaij, C. & Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 269, 192–200.
- Aaronson, I.A. & Cremin, B.J. (1979). Prune belly syndrome in young females. *Urol. Radiol.* 1, 151–155.
- Aberg, A., Westbom, L. & Källén, B. (2001). Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Hum. Dev.* 61, 85–95.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. & Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249.
- Agochukwu, N.B., Pineda-Alvarez, D.E., Keaton, A.A., Warren-Mora, N., Raam, M.S., Kamat, A., Chandrasekharappa, S.C. & Solomon, B.D. (2011). Analysis of FOXF1 and the FOX gene cluster in patients with VACTERL association. *Eur. J. Med. Genet.* 54, 323–328.
- Aitman, T.J., Dong, R., Vyse, T.J., Norsworthy, P.J., Johnson, M.D., Smith, J., Mangion, J., Robertson-Lowe, C., Marshall, A.J., Petretto, E., et al. (2006). Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 439, 851–855.
- Alkan, C., Coe, B.P. & Eichler, E.E. (2011). Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat. Rev. Genet.* 12, 363–376.
- Alkindi, S., Battin, M., Aftimos, S. & Purvis, D. (2012). Focal Dermal Hypoplasia Due to a Novel Mutation in a Boy with Klinefelter Syndrome. *Pediatr Dermatol* DOI: 10.1111/pde.12031.
- Andrä, K., Lassmann, H., Bittner, R., Shorny, S., Fässler, R., Propst, F. & Wiche, G. (1997). Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev.* 11, 3143–3156.
- Angerpointner, T., Radtke, W. & Murken, J.D. (1981). Catamnestic investigations in children with malformations of the gastrointestinal tract and the abdominal wall. *Z. Kinderchir.* 32, 129–144.
- Ansorge, W.J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *N. Biotechnol.* 25, 195–203.
- Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J. & Vidal, F. (2005). Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet. Genome Res.* 111, 297–304.
- Azuma, M., Toyama, R., Laver, E. & Dawid, I.B. (2006). Perturbation of rRNA synthesis in the *bap28* mutation leads to apoptosis mediated by p53 in the zebrafish central nervous system. *J. Biol. Chem.* 281, 13309–13316.
- Babcock, M., Pavlicek, A., Spiteri, E., Kashork, C.D., Ioshikhes, I., Shaffer, L.G., Jurka, J. & Morrow, B.E. (2003). Shuffling of genes within low-copy repeats on 22q11 (LCR22) by Alu-mediated recombination events during evolution. *Genome Res.* 13, 2519–2532.
- Bagai, S., Rubio, E., Cheng, J.-F., Sweet, R., Thomas, R., Fuchs, E., Grady, R., Mitchell, M. & Bassuk, J.A. (2002). Fibroblast growth factor-10 is a mitogen for urothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 23828–23837.
- Bai, Y., Chen, H., Yuan, Z.W. & Wang, W. (2004). Normal and abnormal embryonic development of the anorectum in rats. *Journal of Pediatric Surgery* 39, 587–590.
- Bailey, J.A., Gu, Z., Clark, R.A., Reinert, K., Samonte, R.V., Schwartz, S., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W. & Eichler, E.E. (2002). Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297, 1003–1007.



- Bartels, E., Draaken, M., Kazmierczak, B., Spranger, S., Schramm, C., Baudisch, F., Nöthen, M.M., Schmiedeke, E., Ludwig, M. & Reutter, H. (2011). De novo Partial Trisomy 18p and Partial Monosomy 18q in a Patient with Anorectal Malformation. *Cytogenet. Genome Res.* *134*, 243–248.
- Battaglia, A., Carey, J.C., Cederholm, P., Viskochil, D.H., Brothman, A.R. & Galasso, C. (1999). Natural history of Wolf-Hirschhorn syndrome: experience with 15 cases. *Pediatrics* *103*, 830–836.
- Bau, S., Schracke, N., Kränzle, M., Wu, H., Stähler, P.F., Hoheisel, J.D., Beier, M. & Summerer, D. (2009). Targeted next-generation sequencing by specific capture of multiple genomic loci using low-volume microfluidic DNA arrays. *Anal. Bioanal. Chem.* *393*, 171–175.
- Baust, C., Baillie, G.J. & Mager, D.L. (2002). Insertional polymorphisms of ETn retrotransposons include a disruption of the *wiz* gene in C57BL/6 mice. *Mamm. Genome* *13*, 423–428.
- Begley, D.A., Krupke, D.M., Neuhauser, S.B., Richardson, J.E., Bult, C.J., Eppig, J.T. & Sundberg, J.P. (2012). The Mouse Tumor Biology Database (MTB): a central electronic resource for locating and integrating mouse tumor pathology data. *Vet. Pathol.* *49*, 218–223.
- Bennett, A.H. (1973). Exstrophy of bladder treated by ureterosigmoidostomies. Lone term evaluation. *Urology* *2*, 165–168.
- Bennett, S. (2004). Solexa Ltd. *Pharmacogenomics* *5*, 433–438.
- Bentley, D.R. (2006). Whole-genome re-sequencing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *16*, 545–552.
- Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* *456*, 53–59.
- Biesecker, L.G., Abbott, M., Allen, J., Clericuzio, C., Feuillan, P., Graham, J.M., Jr, Hall, J., Kang, S., Olney, A.H., Lefton, D., et al. (1996). Report from the workshop on Pallister-Hall syndrome and related phenotypes. *Am. J. Med. Genet.* *65*, 76–81.
- Birnbaum, S., Ludwig, K.U., Reutter, H., Herms, S., Steffens, M., Rubini, M., Baluardo, C., Ferrian, M., Almeida de Assis, N., Alblas, M.A., et al. (2009). Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat. Genet.* *41*, 473–477.
- Blauw, H.M., Veldink, J.H., van Es, M.A., van Vught, P.W., Saris, C.G.J., van der Zwaag, B., Franke, L., Burbach, J.P.H., Wokke, J.H., Ophoff, R.A., et al. (2008). Copy-number variation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide screen. *Lancet Neurol.* *7*, 319–326.
- Blomberg, M.I. & Källén, B. (2010). Maternal obesity and morbid obesity: the risk for birth defects in the offspring. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* *88*, 35–40.
- Boockock, G.R. & Donnai, D. (1987). Anorectal malformation: familial aspects and associated anomalies. *Arch. Dis. Child.* *62*, 576–579.
- Borroto-Escuela, D.O., Correia, P.A., Perez Alea, M., Narvaez, M., Garriga, P., Fuxe, K. & Ciruela, F. (2010). Impaired M(3) muscarinic acetylcholine receptor signal transduction through blockade of binding of multiple proteins to its third intracellular loop. *Cell. Physiol. Biochem.* *25*, 397–408.
- Botto, L.D., Khoury, M.J., Mastroiacovo, P., Castilla, E.E., Moore, C.A., Skjaerven, R., Mutchinick, O.M., Borman, B., Cocchi, G., Czeizel, A.E., et al. (1997). The spectrum of congenital anomalies of the VATER association: an international study. *Am. J. Med. Genet.* *71*, 8–15.

- Botto, L.D., Mulinare, J. & Erickson, J.D. (2002). Occurrence of omphalocele in relation to maternal multivitamin use: a population-based study. *Pediatrics* 109, 904–908.
- Botto, L.D. & Yang, Q. (2000). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 151, 862–877.
- Bourillot, P.-Y., Aksoy, I., Schreiber, V., Wianny, F., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N. & Savatier, P. (2009). Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells* 27, 1760–1771.
- Boyadjiev, S.A., Dodson, J.L., Radford, C.L., Ashrafi, G.H., Beaty, T.H., Mathews, R.I., Broman, K.W. & Gearhart, J.P. (2004). Clinical and molecular characterization of the bladder exstrophy-epispadias complex: analysis of 232 families. *BJU Int.* 94, 1337–1343.
- Boyadjiev, S.A., South, S.T., Radford, C.L., Patel, A., Zhang, G., Hur, D.J., Thomas, G.H., Gearhart, J.P. & Stetten, G. (2005). A reciprocal translocation 46,XY,t(8;9)(p11.2;q13) in a bladder exstrophy patient disrupts CNTNAP3 and presents evidence of a pericentromeric duplication on chromosome 9. *Genomics* 85, 622–629.
- Brkanac, Z., Spencer, D., Shendure, J., Robertson, P.D., Matsushita, M., Vu, T., Bird, T.D., Olson, M.V. & Raskind, W.H. (2009). IFRD1 is a candidate gene for SMNA on chromosome 7q22-q23. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 692–697.
- Buchanan, J.A. & Scherer, S.W. (2008). Contemplating effects of genomic structural variation. *Genet. Med.* 10, 639–647.
- Bult, C.J., Eppig, J.T., Blake, J.A., Kadin, J.A. & Richardson, J.E. (2013). The Mouse Genome Database: Genotypes, Phenotypes, and Models of Human Disease. *Nucleic Acids Res.* 41, D885–D891.
- Burbige, K.A., Amodio, J., Berdon, W.E., Hensle, T.W., Blanc, W. & Lattimer, J.K. (1987). Prune belly syndrome: 35 years of experience. *J. Urol.* 137, 86–90.
- Burdine, R.D. & Schier, A.F. (2000). Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes Dev.* 14, 763–776.
- Byron-Scott, R., Haan, E., Chan, A., Bower, C., Scott, H. & Clark, K. (1998). A population-based study of abdominal wall defects in South Australia and Western Australia. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 12, 136–151.
- Calabrese, R., Capriotti, E., Fariselli, P., Martelli, P.L. & Casadio, R. (2009). Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum. Mutat.* 30, 1237–1244.
- Caldamone, A.A. & Woodard, J.R. (2011). Prune belly syndrome. In *Campbell-Walsh Urology*, (Philadelphia: Elsevier Saunders), pp. 3310–3324.
- Caldamone, A.A. & Woodard, J.R. (2012). Prune belly syndrom. In *Prune Belly Syndrome*, A.J. Wein, L.R. Kavoussi, A.C. Novick, A.W. Partin & C.A. Peters, eds. (Philadelphia: Elsevier Saunders), pp. 3310–3324.
- Carey, J.C., Greenbaum, B. & Hall, B.D. (1978). The OEIS complex (omphalocele, exstrophy, imperforate anus, spinal defects). *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 14, 253–263.
- Carter, C.O. (1976). Genetics of common single malformations. *Br. Med. Bull.* 32, 21–26.
- Catala, M. (2002). Genetic control of caudal development. *Clin. Genet.* 61, 89–96.
- Chen, C.-C., Hwang, J.-K. & Yang, J.-M. (2009). (PS)2-v2: template-based protein structure prediction server. *BMC Bioinformatics* 10, 366.

- Chen, C.J. (1999). The treatment of imperforate anus: experience with 108 patients. *J. Pediatr. Surg.* 34, 1728–1732.
- Cheng, W., Jacobs, W.B., Zhang, J.J.R., Moro, A., Park, J.-H., Kushida, M., Qiu, W., Mills, A.A. & Kim, P.C.W. (2006). DeltaNp63 plays an anti-apoptotic role in ventral bladder development. *Development* 133, 4783–4792.
- Cheverud, J.M., Fawcett, G.L., Jarvis, J.P., Norgard, E.A., Pavlicev, M., Pletscher, L.S., Polonsky, K.S., Ye, H., Bell, G.I. & Semenkovich, C.F. (2010). Calpain-10 is a component of the obesity-related quantitative trait locus Adip1. *J. Lipid Res.* 51, 907–913.
- Cheyette, B.N.R., Waxman, J.S., Miller, J.R., Takemaru, K.-I., Sheldahl, L.C., Khlebtsova, N., Fox, E.P., Earnest, T. & Moon, R.T. (2002). Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev. Cell* 2, 449–461.
- Ching, B.J., Wittler, L., Proske, J., Yagnik, G., Draaken, M., Gearhart, J.P., Ludwig, M. & Boyadjiev, S.A. (2010). p63 (TP73L) a key player in embryonic urogenital development with significant dysregulation in human bladder exstrophy tissue. *Int. J. Mol. Med.* 26, 861–817.
- Chipail, A., Constantinescu, V., Covic, M. & Angheloni, T. (1976). [Phenotypic and cytogenetic analysis of an unusual malformative syndrome (trisomy 9 p+)]. *Rev. Pediatr. Obstet. Ginecol. Pediatr.* 25, 201–210.
- Cho, S., Moore, S.P. & Fangman, T. (2001). One hundred three consecutive patients with anorectal malformations and their associated anomalies. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 155, 587–591.
- Chotteau-Lelièvre, A., Dollé, P. & Gofflot, F. (2006). Expression analysis of murine genes using in situ hybridization with radioactive and nonradioactively labeled RNA probes. *Methods Mol. Biol.* 326, 61–87.
- Choy, K.W., Setlur, S.R., Lee, C. & Lau, T.K. (2010). The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing. *BJOG* 117, 391–398.
- Coin, L.J.M., Asher, J.E., Walters, R.G., Moustafa, J.S.E.-S., de Smith, A.J., Sladek, R., Balding, D.J., Froguel, P. & Blakemore, A.I.F. (2010). cnvHap: an integrative population and haplotype-based multiplatform model of SNPs and CNVs. *Nat. Methods* 7, 541–546.
- Colella, S., Yau, C., Taylor, J.M., Mirza, G., Butler, H., Clouston, P., Bassett, A.S., Seller, A., Holmes, C.C. & Ragoussis, J. (2007). QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res.* 35, 2013–2025.
- Conrad, D.F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., Aerts, J., Andrews, T.D., Barnes, C., Campbell, P., et al. (2010). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464, 704–712.
- Cook, R.C.M. (1990). Anorectal malformations. In *Neonatal Surgery*, J. Lister & I.M. Irving, eds. (London: Butterworth), pp. 547–570.
- Cooper, G.M., Nickerson, D.A. & Eichler, E.E. (2007). Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat. Genet.* 39, S22–29.
- Correa, A., Gilboa, S.M., Besser, L.M., Botto, L.D., Moore, C.A., Hobbs, C.A., Cleves, M.A., Riehle-Colarusso, T.J., Waller, D.K. & Reece, E.A. (2008). Diabetes mellitus and birth defects. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 237.e1–9.

- Costa, E.C., Ferreira, C.T., Salle, J.L.P. & Fraga, J.C. (2011). Diagnosis and management of congenital rectourethral fistula in a child with long tubular duplication of the colon and Klippel-Feil syndrome. *J. Pediatr. Surg.* 46, 2184–2186.
- Courtens, W., Schramme, I. & Laridon, A. (2008). Microduplication 22q11.2: a benign polymorphism or a syndrome with a very large clinical variability and reduced penetrance?--Report of two families. *Am. J. Med. Genet. A* 146A, 758–763.
- Crétolle, C., Pelet, A., Sanlaville, D., Zérah, M., Amiel, J., Jaubert, F., Révillon, Y., Baala, L., Munnich, A., Nihoul-Fékété, C., et al. (2008). Spectrum of HLXB9 gene mutations in Currarino syndrome and genotype-phenotype correlation. *Hum. Mutat.* 29, 903–910.
- Cuschieri, A. (2001). Descriptive epidemiology of isolated anal anomalies: A survey of 4.6 million births in Europe. *Am. J. Med. Genet.* 103, 207–215.
- Cuschieri, A. (2002). Anorectal anomalies associated with or as part of other anomalies. *Am. J. Med. Genet.* 110, 122–130.
- Czeizel, A. & Ludányi, I. (1985). An aetiological study of the VACTERL-association. *Eur. J. Pediatr.* 144, 331–337.
- Dellinger, A.E., Saw, S.-M., Goh, L.K., Seielstad, M., Young, T.L. & Li, Y.-J. (2010). Comparative analyses of seven algorithms for copy number variant identification from single nucleotide polymorphism arrays. *Nucleic Acids Res.* 38, e105.
- Deng, Y., Hu, L.-S. & Lu, G.-X. (2006). Expression and identification of a novel apoptosis gene Spata17 (MSRG-11) in mouse spermatogenic cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 38, 37–45.
- Diez-Pardo, J.A., Mariño, J.M., Baoquan, Q., Delgado-Baeza, E., Fernáñez, A., Morales, M.C. & Tovar, J.A. (1995). Neural tube defects: an experimental model in the foetal rat. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 5, 198–202.
- Dorey, K. & Amaya, E. (2010). FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 137, 3731–3742.
- Draaken, M., Mughal, S.S., Pennimpede, T., Wolter, S., Wittler, L., Ebert, A.-K., Rösch, W., Stein, R., Bartels, E., Schmidt, D., et al. (2013). Isolated bladder exstrophy associated with a de novo 0.9 Mb microduplication on chromosome 19p13.12. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 97, 133–139.
- Draaken, M., Prins, W., Zeidler, C., Hilger, A., Mughal, S.S., Latus, J., Boemers, T.M., Schmidt, D., Schmiedeke, E., Szychalski, N., et al. (2012). Involvement of the WNT and FGF signaling pathways in non-isolated anorectal malformations: Sequencing analysis of WNT3A, WNT5A, WNT11, DACT1, FGF10, FGFR2 and the T gene. *Int. J. Mol. Med.* 10.3892/ijmm.2012.1124.
- Draaken, M., Proske, J., Schramm, C., Wittler, L., Bartels, E., Nöthen, M.M., Reutter, H. & Ludwig, M. (2010a). Embryonic expression of the cysteine rich protein 61 (CYR61) gene: A candidate for the development of human epispadias. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 88, 546–550.
- Draaken, M., Reutter, H., Schramm, C., Bartels, E., Boemers, T.M., Ebert, A.-K., Rösch, W., Schröder, A., Stein, R., Moebus, S., et al. (2010b). Microduplications at 22q11.21 are associated with non-syndromic classic bladder exstrophy. *Eur. J. Med. Genet.* 53, 55–60.

- Droege, M. & Hill, B. (2008). The Genome Sequencer FLX System--longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J. Biotechnol.* 136, 3–10.
- Druschel, C.M. (1995). A descriptive study of prune belly in New York State, 1983 to 1989. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 149, 70–76.
- Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S.F., Collins, P.J., Davis, C.A., Doyle, F., Epstein, C.B., Fietze, S., Harrow, J., Kaul, R., et al. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57–74.
- Eagle, J.F., Jr & Barrett, G.S. (1950). Congenital deficiency of abdominal musculature with associated genitourinary abnormalities: A syndrome. Report of 9 cases. *Pediatrics* 6, 721–736.
- Ebert, A.K., Brookman-Amisshah, S. & Rösch, W.H. (2008). [Urological manifestations of Down syndrome: significance and long-term complications -- our own patient cohort with an overview]. *Urologe A* 47, 337–341.
- Ebert, A.-K., Reutter, H., Ludwig, M. & Rösch, W.H. (2009). The exstrophy-epispadias complex. *Orphanet. J. Rare. Dis.* 4, 23.
- Edelmann, L., Pandita, R.K., Spiteri, E., Funke, B., Goldberg, R., Palanisamy, N., Chaganti, R.S., Magenis, E., Shprintzen, R.J. & Morrow, B.E. (1999). A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1157–1167.
- Edvardson, S., Shaag, A., Zenvirt, S., Erlich, Y., Hannon, G.J., Shanske, A.L., Gomori, J.M., Ekstein, J. & Elpeleg, O. (2010). Joubert syndrome 2 (JBTS2) in Ashkenazi Jews is associated with a TMEM216 mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 93–97.
- Eichler, E.E. (2001). Recent duplication, domain accretion and the dynamic mutation of the human genome. *Trends Genet.* 17, 661–669.
- El-Hattab, A.W., Skorupski, J.C., Hsieh, M.H., Breman, A.M., Patel, A., Cheung, S.W. & Craigen, W.J. (2010). OEIS complex associated with chromosome 1p36 deletion: A case report and review. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 504–511.
- ENCODE Project Consortium (2004). The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* 306, 636–640.
- Endo, M., Hayashi, A., Ishihara, M., Maie, M., Nagasaki, A., Nishi, T. & Saeki, M. (1999). Analysis of 1,992 patients with anorectal malformations over the past two decades in Japan. Steering Committee of Japanese Study Group of Anorectal Anomalies. *J. Pediatr. Surg.* 34, 435–441.
- Engels, H., Wohlleber, E., Zink, A., Hoyer, J., Ludwig, K.U., Brockschmidt, F.F., Wieczorek, D., Moog, U., Hellmann-Mersch, B., Weber, R.G., et al. (2009). A novel microdeletion syndrome involving 5q14.3-q15: clinical and molecular cytogenetic characterization of three patients. *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 1592–1599.
- Ensenauer, R.E., Adeyinka, A., Flynn, H.C., Michels, V.V., Lindor, N.M., Dawson, D.B., Thorland, E.C., Lorentz, C.P., Goldstein, J.L., McDonald, M.T., et al. (2003). Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1027–1040.
- Eppig, J.T., Blake, J.A., Bult, C.J., Kadin, J.A. & Richardson, J.E. (2012). The Mouse Genome Database (MGD): comprehensive resource for genetics and genomics of the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* 40, D881–886.

- Fairbanks, T.J., De Langhe, S., Sala, F.G., Warburton, D., Anderson, K.D., Bellusci, S. & Burns, R.C. (2004). Fibroblast growth factor 10 (Fgf10) invalidation results in anorectal malformation in mice. *J. Pediatr. Surg.* 39, 360–365.
- Falcone, R.A., Jr, Levitt, M.A., Peña, A. & Bates, M. (2007). Increased heritability of certain types of anorectal malformations. *J. Pediatr. Surg.* 42, 124–127.
- Fanciulli, M., Norsworthy, P.J., Petretto, E., Dong, R., Harper, L., Kamesh, L., Heward, J.M., Gough, S.C.L., de Smith, A., Blakemore, A.I.F., et al. (2007). FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat. Genet.* 39, 721–723.
- Farrugia, M.-K. & Woolf, A.S. (2010). Congenital urinary bladder outlet obstruction. *Fetal and Maternal Medicine Review* 21, 55–73.
- Feenstra, I., Vissers, L.E.L.M., Orsel, M., van Kessel, A.G., Brunner, H.G., Veltman, J.A. & van Ravenswaaij-Arts, C.M.A. (2007). Genotype-phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high-resolution array CGH: an update of the phenotypic map. *Am. J. Med. Genet. A* 143A, 1858–1867.
- Feldkamp, M.L., Botto, L.D., Amar, E., Bakker, M.K., Bermejo-Sánchez, E., Bianca, S., Canfield, M.A., Castilla, E.E., Clementi, M., Csaky-Szunyogh, M., et al. (2011). Cloacal exstrophy: an epidemiologic study from the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 157C, 333–343.
- Feuk, L., Carson, A.R. & Scherer, S.W. (2006a). Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* 7, 85–97.
- Feuk, L., Marshall, C.R., Wintle, R.F. & Scherer, S.W. (2006b). Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum. Mol. Genet.* 15 *Spec No 1*, R57–66.
- Fiegler, H., Redon, R., Andrews, D., Scott, C., Andrews, R., Carder, C., Clark, R., Dovey, O., Ellis, P., Feuk, L., et al. (2006). Accurate and reliable high-throughput detection of copy number variation in the human genome. *Genome Res.* 16, 1566–1574.
- Finger, J.H., Smith, C.M., Hayamizu, T.F., McCright, I.J., Eppig, J.T., Kadin, J.A., Richardson, J.E. & Ringwald, M. (2011). The mouse Gene Expression Database (GXD): 2011 update. *Nucleic Acids Res.* 39, D835–841.
- Firth, H.V. (2009). 22q11.2 Duplication (Seattle: University of Washington, Seattle).
- Firth, H.V., Richards, S.M., Bevan, A.P., Clayton, S., Corpas, M., Rajan, D., Van Vooren, S., Moreau, Y., Pettett, R.M. & Carter, N.P. (2009). DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 524–533.
- Foster, P.M.D. & Harris, M.W. (2005). Changes in androgen-mediated reproductive development in male rat offspring following exposure to a single oral dose of flutamide at different gestational ages. *Toxicol. Sci.* 85, 1024–1032.
- Fowler, C.J., Griffiths, D. & de Groat, W.C. (2008). The neural control of micturition. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 453–466.
- Frías, J.L., Frías, J.P., Frías, P.A. & Martínez-Frías, M.L. (2007). Infrequently studied congenital anomalies as clues to the diagnosis of maternal diabetes mellitus. *Am. J. Med. Genet. A* 143A, 2904–2909.
- Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G.J., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A. & van den Heuvel, L.P. (1995). A candidate genetic risk factor for

- vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 10, 111–113.
- Fuchs, P., Zörer, M., Reipert, S., Reznicek, G.A., Propst, F., Walko, G., Fischer, I., Bauer, J., Leschnik, M.W., Lüscher, B., et al. (2009). Targeted inactivation of a developmentally regulated neural plectin isoform (plectin 1c) in mice leads to reduced motor nerve conduction velocity. *J. Biol. Chem.* 284, 26502–26509.
- Gambhir, L., Höller, T., Müller, M., Schott, G., Vogt, H., Detlefsen, B., Ebert, A.-K., Fisch, M., Beaudoin, S., Stein, R., et al. (2008). Epidemiological survey of 214 families with bladder exstrophy-epispadias complex. *J. Urol.* 179, 1539–1543.
- Garcia-Barceló, M.-M., Chi-Hang Lui, V., Miao, X., So, M., Yuk-yu Leon, T., Yuan, Z., Li, L., Liu, L., Wang, B., Sun, X., et al. (2008). Mutational analysis of SHH and GLI3 in anorectal malformations. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 82, 644–648.
- Gearhart, J.P. (2002). *Exstrophy, epispadias, and other bladder anomalies* (Philadelphia: WB Saunders).
- Ghebranious, N., Blank, R.D., Raggio, C.L., Staubli, J., McPherson, E., Ivacic, L., Rasmussen, K., Jacobsen, F.S., Faciszewski, T., Burmester, J.K., et al. (2008). A missense T (Brachyury) mutation contributes to vertebral malformations. *J. Bone Miner. Res.* 23, 1576–1583.
- Gonzalez, E., Kulkarni, H., Bolivar, H., Mangano, A., Sanchez, R., Catano, G., Nibbs, R.J., Freedman, B.I., Quinones, M.P., Bamshad, M.J., et al. (2005). The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307, 1434–1440.
- Goto, M., Sumiyoshi, H., Sakai, T., Fässler, R., Ohashi, S., Adachi, E., Yoshioka, H. & Fujiwara, S. (2006). Elimination of epiplakin by gene targeting results in acceleration of keratinocyte migration in mice. *Mol. Cell. Biol.* 26, 548–558.
- Grano, C., Aminoff, D., Lucidi, F. & Violani, C. (2011). Long-term disease-specific quality of life in adult anorectal malformation patients. *J. Pediatr. Surg.* 46, 691–698.
- Green, N.E., Lowery, E.R. & Thomas, R. (1993). Orthopaedic aspects of prune belly syndrome. *J. Pediatr. Orthop.* 13, 496–501.
- Greene, W.B., Dias, L.S., Lindseth, R.E. & Torch, M.A. (1991). Musculoskeletal problems in association with cloacal exstrophy. *J. Bone Joint Surg. Am.* 73, 551–560.
- Greskovich, F.J., 3rd & Nyberg, L.M., Jr (1988). The prune belly syndrome: a review of its etiology, defects, treatment and prognosis. *J. Urol.* 140, 707–712.
- Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A.N. & Aaronson, S.A. (2010). Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev.* 24, 2517–2530.
- Gunderson, K.L., Kruglyak, S., Graige, M.S., Garcia, F., Kermani, B.G., Zhao, C., Che, D., Dickinson, T., Wickham, E., Bierle, J., et al. (2004). Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome Res.* 14, 870–877.
- Gunderson, K.L., Steemers, F.J., Lee, G., Mendoza, L.G. & Chee, M.S. (2005). A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat. Genet.* 37, 549–554.
- Guo, X., Freyer, L., Morrow, B. & Zheng, D. (2011). Characterization of the past and current duplication activities in the human 22q11.2 region. *BMC Genomics* 12, 71.

- Guris, D.L., Fantes, J., Tara, D., Druker, B.J. & Imamoto, A. (2001). Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat. Genet.* 27, 293–298.
- Halder, A., Sharma, A.K., Phadke, S.R., Jain, A. & Agarwal, S.S. (1994). OEIS complex with craniofacial anomalies--defect of blastogenesis? *Am. J. Med. Genet.* 53, 21–23.
- Haremak, T., Tanaka, Y., Hongo, I., Yuge, M. & Okamoto, H. (2003). Integration of multiple signal transducing pathways on Fgf response elements of the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. *Development* 130, 4907–4917.
- Harmsen, M.-B., Azzarello-Burri, S., García González, M.M., Gillessen-Kaesbach, G., Meinecke, P., Müller, D., Rauch, A., Rossier, E., Seemanova, E., Spaich, C., et al. (2009). Goltz-Gorlin (focal dermal hypoplasia) and the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome: no evidence of genetic overlap. *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 1207–1215.
- Hasse, W. (1976). Associated malformation with anal and rectal atresiae. *Prog. Pediatr. Surg.* 9, 99–103.
- Hassett, S., Smith, G.H.H. & Holland, A.J.A. (2012). Prune belly syndrome. *Pediatr. Surg. Int.* 28, 219–228.
- Hassink, E.A., Rieu, P.N., Hamel, B.C., Severijnen, R.S., vd Staak, F.H. & Festen, C. (1996). Additional congenital defects in anorectal malformations. *Eur. J. Pediatr.* 155, 477–482.
- Heard, P.L., Carter, E.M., Crandall, A.C., Sebold, C., Hale, D.E. & Cody, J.D. (2009). High resolution genomic analysis of 18q- using oligo-microarray comparative genomic hybridization (aCGH). *Am. J. Med. Genet. A* 149A, 1431–1437.
- Henrichsen, C.N., Chaignat, E. & Reymond, A. (2009). Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 18, R1–8.
- Hesser, J.W., Murata, Y. & Swallow, C.I. (1984). Exstrophy of cloaca with omphalocele: two cases. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 150, 1004–1006.
- Hilger, A., Schramm, C., Draaken, M., Mughal, S.S., Dworschak, G., Bartels, E., Hoffmann, P., Nöthen, M.M., Reutter, H. & Ludwig, M. (2012). Familial occurrence of the VATER/VACTERL association. *Pediatr. Surg. Int.* 28, 725–729.
- Hirai, Y. & Kuwabara, N. (1990). Transplacentally induced anorectal malformations in rats. *J. Pediatr. Surg.* 25, 812–816.
- Hohenstein, A.C. & Roche, P.A. (2001). SNAP-29 is a promiscuous syntaxin-binding SNARE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 167–171.
- Hoischen, A., van Bon, B.W.M., Gilissen, C., Arts, P., van Lier, B., Stehouwer, M., de Vries, P., de Reuver, R., Wieskamp, N., Mortier, G., et al. (2010). De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat. Genet.* 42, 483–485.
- Hollox, E.J., Huffmeier, U., Zeeuwen, P.L.J.M., Palla, R., Lascorz, J., Rodijk-Olthuis, D., van de Kerkhof, P.C.M., Traupe, H., de Jongh, G., den Heijer, M., et al. (2008). Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat. Genet.* 40, 23–25.
- Holschneider, A., Hutson, J., Peña, A., Beket, E., Chatterjee, S., Coran, A., Davies, M., Georgeson, K., Grosfeld, J., Gupta, D., et al. (2005). Preliminary report on the International Conference for the Development of Standards for the Treatment of Anorectal Malformations. *J. Pediatr. Surg.* 40, 1521–1526.



- Hupé, P., Stransky, N., Thiery, J.-P., Radvanyi, F. & Barillot, E. (2004). Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. *Bioinformatics* 20, 3413–3422.
- Husmann, D. & Vandersteen, D. (1999). *Anatomy of the cloacal exstrophy* (New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers).
- Hyman, E.D. (1988). A new method of sequencing DNA. *Anal. Biochem.* 174, 423–436.
- Iafrate, A.J., Feuk, L., Rivera, M.N., Listewnik, M.L., Donahoe, P.K., Qi, Y., Scherer, S.W. & Lee, C. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.* 36, 949–951.
- Ince, T.A., Cviko, A.P., Quade, B.J., Yang, A., McKeon, F.D., Mutter, G.L. & Crum, C.P. (2002). p63 Coordinates anogenital modeling and epithelial cell differentiation in the developing female urogenital tract. *Am. J. Pathol.* 161, 1111–1117.
- International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems (1987). Epidemiology of bladder exstrophy and epispadias: a communication from the International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. *Teratology* 36, 221–227.
- International HapMap Consortium (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299–1320.
- International HapMap Consortium (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851–861.
- International Human Genome Sequencing Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945.
- International Schizophrenia Consortium (2008). Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 455, 237–241.
- Itsara, A., Cooper, G.M., Baker, C., Girirajan, S., Li, J., Absher, D., Krauss, R.M., Myers, R.M., Ridker, P.M., Chasman, D.I., et al. (2009). Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 148–161.
- Itsara, A., Wu, H., Smith, J.D., Nickerson, D.A., Romieu, I., London, S.J. & Eichler, E.E. (2010). De novo rates and selection of large copy number variation. *Genome Res.* 20, 1469–1481.
- Ives, E., Coffey, R. & Carter, C.O. (1980). A family study of bladder exstrophy. *J. Med. Genet.* 17, 139–141.
- Jadeja, S., Smyth, I., Pitera, J.E., Taylor, M.S., van Haelst, M., Bentley, E., McGregor, L., Hopkins, J., Chalepakis, G., Philip, N., et al. (2005). Identification of a new gene mutated in Fraser syndrome and mouse myelencephalic blebs. *Nat. Genet.* 37, 520–525.
- Jaffray, J.Y., Geneix, A., Goumy, P., Perissel, B., Menut, G. & Malet, P. (1980). Partial trisomy 18 (pter leads to q122) of maternal origin. *Ann. Genet.* 23, 224–227.
- Jalali, G.R., Vorstman, J.A.S., Errami, A., Vijzelaar, R., Biegel, J., Shaikh, T. & Emanuel, B.S. (2008). Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Hum. Mutat.* 29, 433–440.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Neumann, R. & Keyte, J. (1988). Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 10953–10971.
- Jenetzky, E. (2007). Prevalence estimation of anorectal malformations using German diagnosis related groups system. *Pediatr. Surg. Int.* 23, 1161–1165.
- Johnston, J.J., Teer, J.K., Cherukuri, P.F., Hansen, N.F., Loftus, S.K., Chong, K., Mullikin, J.C. & Biesecker, L.G. (2010). Massively parallel sequencing of exons on the X chromosome

- identifies RBM10 as the gene that causes a syndromic form of cleft palate. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 743–748.
- Jordan, M., Poole, C.A. & Fogel, B.J. (1968). Extrophy of the bladder associated with congenital rubella syndrome. *J. Fla. Med. Assoc.* 55, 98–99.
- Jovankovičová, A., Jakubíková, J. & Durovčíková, D. (2012). A case of Klippel-Feil syndrome with congenital enlarged Eustachian tube. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 76, 596–600.
- Källén, K., Castilla, E.E., Robert, E., Mastroiacovo, P. & Källén, B. (2000). OEIS complex--a population study. *Am. J. Med. Genet.* 92, 62–68.
- Källén, K., Mastroiacovo, P., Castilla, E.E., Robert, E. & Källén, B. (2001). VATER non-random association of congenital malformations: study based on data from four malformation registers. *Am. J. Med. Genet.* 101, 26–32.
- Kalter, H. (1968). Sporadic congenital malformations of newborn inbred mice. *Teratology* 1, 193–199.
- Kawakubo, T., Yasukochi, A., Okamoto, K., Okamoto, Y., Nakamura, S. & Yamamoto, K. (2011). The role of cathepsin E in terminal differentiation of keratinocytes. *Biol. Chem.* 392, 571–585.
- Kelley, R.I., Zackai, E.H., Emanuel, B.S., Kistenmacher, M., Greenberg, F. & Punnett, H.H. (1982). The association of the DiGeorge anomaly with partial monosomy of chromosome 22. *J. Pediatr.* 101, 197–200.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M. & Haussler, D. (2002). The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 12, 996–1006.
- Keppler-Noreuil, K., Gorton, S., Foo, F., Yankowitz, J. & Keegan, C. (2007). Prenatal ascertainment of OEIS complex/cloacal exstrophy - 15 new cases and literature review. *Am. J. Med. Genet. A* 143A, 2122–2128.
- Keppler-Noreuil, K.M. (2001). OEIS complex (omphalocele-exstrophy-imperforate anus-spinal defects): a review of 14 cases. *Am. J. Med. Genet.* 99, 271–279.
- Kimmel, S.G., Mo, R., Hui, C.C. & Kim, P.C. (2000). New mouse models of congenital anorectal malformations. *J. Pediatr. Surg.* 35, 227–230.
- Kireeva, M.L., MO, F.E., Yang, G.P. & Lau, L.F. (1996). Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1326–1334.
- Klopocki, E. & Mundlos, S. (2011). Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 12, 53–72.
- Kluth, D. (2010). Embryology of anorectal malformations. *Semin. Pediatr. Surg.* 19, 201–208.
- Kodaka, T., Kanamori, Y., Sugiyama, M. & Hashizume, K. (2004). A case of acrocephalosyndactyly with low imperforate anus. *J. Pediatr. Surg.* 39, E32–34.
- Kosaki, R., Fukuhara, Y., Kosuga, M., Okuyama, T., Kawashima, N., Honna, T., Ueoka, K. & Kosaki, K. (2005). OEIS complex with del(3)(q12.2q13.2). *Am. J. Med. Genet. A* 135, 224–226.
- Kosho, T., Nakamura, T., Kawame, H., Baba, A., Tamura, M. & Fukushima, Y. (2006). Neonatal management of trisomy 18: clinical details of 24 patients receiving intensive treatment. *Am. J. Med. Genet. A* 140, 937–944.
- Krepelová, A., Baxová, A., Calda, P., Plavka, R. & Kapras, J. (1998). FGFR2 gene mutation (Tyr375Cys) in a new case of Beare-Stevenson syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 76, 362–364.

- Krüger, V., Khoshvaghti, M., Reutter, H., Vogt, H., Boemers, T.M. & Ludwig, M. (2008a). Investigation of FGF10 as a candidate gene in patients with anorectal malformations and exstrophy of the cloaca. *Pediatr. Surg. Int.* 24, 893–897.
- Krüger, V., Khoshvaghti, M., Reutter, H., Vogt, H., Boemers, T.M. & Ludwig, M. (2008b). Investigation of FGF10 as a candidate gene in patients with anorectal malformations and exstrophy of the cloaca. *Pediatr. Surg. Int.* 24, 893–897.
- Kumar, R.A., KaraMohamed, S., Sudi, J., Conrad, D.F., Brune, C., Badner, J.A., Gilliam, T.C., Nowak, N.J., Cook, E.H., Jr, Dobyns, W.B., et al. (2008). Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum. Mol. Genet.* 17, 628–638.
- Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C. & Sninsky, J.J. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 18, 999–1005.
- Ladd, W.E. & Gross, R.E. (1934). Congenital malformations of anus and rectum: Report of 162 cases. *Am. J. Surg.* 23, 167–183.
- Lako, M., Strachan, T., Bullen, P., Wilson, D.I., Robson, S.C. & Lindsay, S. (1998). Isolation, characterisation and embryonic expression of WNT11, a gene which maps to 11q13.5 and has possible roles in the development of skeleton, kidney and lung. *Gene* 219, 101–110.
- Lalonde, E., Albrecht, S., Ha, K.C.H., Jacob, K., Bolduc, N., Polychronakos, C., Dechelotte, P., Majewski, J. & Jabado, N. (2010). Unexpected allelic heterogeneity and spectrum of mutations in Fowler syndrome revealed by next-generation exome sequencing. *Hum. Mutat.* 31, 918–923.
- Lambrecht, W. & Lierse, W. (1987). The internal sphincter in anorectal malformations: morphologic investigations in neonatal pigs. *J. Pediatr. Surg.* 22, 1160–1168.
- Lau, L.F. & Nathans, D. (1985). Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J.* 4, 3145–3151.
- LeHeup, B.P., Masutti, J.P., Droullé, P. & Tisserand, J. (1995). The Antley-Bixler syndrome: report of two familial cases with severe renal and anal anomalies. *Eur. J. Pediatr.* 154, 130–133.
- Leonard, N.J. & Tomkins, D.J. (2002). Diploid/tetraploid/t(1;6) mosaicism in a 17-year-old female with hypomelanosis of Ito, multiple congenital anomalies, and body asymmetry. *Am. J. Med. Genet.* 112, 86–90.
- Levy, D., Ronemus, M., Yamrom, B., Lee, Y., Leotta, A., Kendall, J., Marks, S., Lakshmi, B., Pai, D., Ye, K., et al. (2011). Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron* 70, 886–897.
- Li, B., Krishnan, V.G., Mort, M.E., Xin, F., Kamati, K.K., Cooper, D.N., Mooney, S.D. & Radivojac, P. (2009). Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* 25, 2744–2750.
- Liao, J., Kochilas, L., Nowotschin, S., Arnold, J.S., Aggarwal, V.S., Epstein, J.A., Brown, M.C., Adams, J. & Morrow, B.E. (2004). Full spectrum of malformations in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome mouse models by altering Tbx1 dosage. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1577–1585.
- Lickert, H., Kispert, A., Kutsch, S. & Kemler, R. (2001). Expression patterns of Wnt genes in mouse gut development. *Mech. Dev.* 105, 181–184.

- Lin, H.J., Ndiforchu, F. & Patell, S. (1993). Exstrophy of the cloaca in a 47,XXX child: review of genitourinary malformations in triple-X patients. *Am. J. Med. Genet.* 45, 761–763.
- Lin, H.-J., Wan, L., Chen, W.-C., Lin, J.-M., Lin, C.-J. & Tsai, F.-J. (2012). Muscarinic acetylcholine receptor 3 is dominant in myopia progression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 6519–6525.
- Lin, H.-Y., Lin, S.-P., Chen, Y.-J., Hung, H.-Y., Kao, H.-A., Hsu, C.-H., Chen, M.-R., Chang, J.-H., Ho, C.-S., Huang, F.-Y., et al. (2006). Clinical characteristics and survival of trisomy 18 in a medical center in Taipei, 1988–2004. *Am. J. Med. Genet. A* 140, 945–951.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lizcano-Gil, L.A., García-Cruz, D. & Sánchez-Corona, J. (1995). Omphalocele-exstrophy-imperforate-anus-spina bifida (OEIS) complex in a male prenatally exposed to diazepam. *Arch. Med. Res.* 26, 95–96.
- Locke, D.P., Segraves, R., Nicholls, R.D., Schwartz, S., Pinkel, D., Albertson, D.G. & Eichler, E.E. (2004). BAC microarray analysis of 15q11-q13 rearrangements and the impact of segmental duplications. *J. Med. Genet.* 41, 175–182.
- Loder, R.T., Guiboux, J.P., Bloom, D.A. & Hensinger, R.N. (1992). Musculoskeletal aspects of prune-belly syndrome. Description and pathogenesis. *Am. J. Dis. Child.* 146, 1224–1229.
- Lu, X.-Y., Phung, M.T., Shaw, C.A., Pham, K., Neil, S.E., Patel, A., Sahoo, T., Bacino, C.A., Stankiewicz, P., Kang, S.-H.L., et al. (2008). Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 122, 1310–1318.
- Lubinsky, M. & Rapoport, P. (1983). Transient fetal hydrops and “prune belly” in one identical female twin. *N. Engl. J. Med.* 308, 256–257.
- Ludwig, M., Ching, B., Reutter, H. & Boyadjiev, S.A. (2009a). Bladder exstrophy-epispadias complex. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 85, 509–522.
- Ludwig, M., Rüschemdorf, F., Saar, K., Hübner, N., Siekmann, L., Boyadjiev, S.A. & Reutter, H. (2009b). Genome-wide linkage scan for bladder exstrophy-epispadias complex. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 85, 174–178.
- Ludwig, M., Utsch, B. & Reutter, H. (2005). Genetic and molecular biological aspects of the bladder exstrophy-epispadias complex (BEEC). *Urologe A* 44, 1037–1038, 1040–1044.
- Lundin, J., Söderhäll, C., Lundén, L., Hammarsjö, A., White, I., Schoumans, J., Läckgren, G., Kockum, C.C. & Nordenskjöld, A. (2010). 22q11.2 microduplication in two patients with bladder exstrophy and hearing impairment. *Eur. J. Med. Genet.* 53, 61–65.
- Lupski, J.R. (1998). Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet.* 14, 417–422.
- Lupski, J.R. (2007). Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat. Genet.* 39, S43–47.
- Malhotra, D. & Sebat, J. (2012). CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 148, 1223–1241.
- Mangold, E., Ludwig, K.U., Birnbaum, S., Baluado, C., Ferrian, M., Herms, S., Reutter, H., de Assis, N.A., Chawa, T.A., Mattheisen, M., et al. (2010). Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat. Genet.* 42, 24–26.

- Männer, J. & Kluth, D. (2005). The morphogenesis of the exstrophy-epispadias complex: a new concept based on observations made in early embryonic cases of cloacal exstrophy. *Anat. Embryol.* 210, 51–57.
- Mansfield, K.J., Liu, L., Moore, K.H., Vaux, K.J., Millard, R.J. & Burcher, E. (2007). Molecular characterization of M2 and M3 muscarinic receptor expression in bladder from women with refractory idiopathic detrusor overactivity. *BJU Int.* 99, 1433–1438.
- Marcelis, C., de Blaauw, I. & Brunner, H. (2011). Chromosomal anomalies in the etiology of anorectal malformations: a review. *Am. J. Med. Genet. A* 155A, 2692–2704.
- Mardis, E.R. (2006). Anticipating the 1,000 dollar genome. *Genome Biol.* 7, 112.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.-J., Chen, Z., et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380.
- Marical, H., Le Bris, M.J., Douet-Guilbert, N., Parent, P., Descourt, J.P., Morel, F. & De Braekeleer, M. (2007). 18p trisomy: a case of direct 18p duplication characterized by molecular cytogenetic analysis. *Am. J. Med. Genet. A* 143A, 2192–2195.
- Marshall, C.R., Noor, A., Vincent, J.B., Lionel, A.C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., et al. (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 477–488.
- Martínez-Frías, M.L., Bermejo, E. & Rodríguez-Pinilla, E. (2000). Anal atresia, vertebral, genital, and urinary tract anomalies: a primary polytopic developmental field defect identified through an epidemiological analysis of associations. *Am. J. Med. Genet.* 95, 169–173.
- Martínez-Frías, M.L., Bermejo, E., Rodríguez-Pinilla, E. & Frías, J.L. (2001). Exstrophy of the cloaca and exstrophy of the bladder: two different expressions of a primary developmental field defect. *Am. J. Med. Genet.* 99, 261–269.
- Matsui, M., Motomura, D., Karasawa, H., Fujikawa, T., Jiang, J., Komiya, Y., Takahashi, S. & Taketo, M.M. (2000). Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9579–9584.
- Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 560–564.
- McBride, L.J., Koepf, S.M., Gibbs, R.A., Salser, W., Mayrand, P.E., Hunkapiller, M.W. & Kronick, M.N. (1989). Automated DNA sequencing methods involving polymerase chain reaction. *Clin. Chem.* 35, 2196–2201.
- McCarroll, S.A., Hadnott, T.N., Perry, G.H., Sabeti, P.C., Zody, M.C., Barrett, J.C., Dallaire, S., Gabriel, S.B., Lee, C., Daly, M.J., et al. (2006). Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat. Genet.* 38, 86–92.
- McCarroll, S.A., Huett, A., Kuballa, P., Chlewicki, S.D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M.C., Hall, J.L., Brant, S.R., Cho, J.H., et al. (2008a). Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40, 1107–1112.
- McCarroll, S.A., Kuruvilla, F.G., Korn, J.M., Cawley, S., Nemesh, J., Wysoker, A., Shapero, M.H., de Bakker, P.I.W., Maller, J.B., Kirby, A., et al. (2008b). Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat. Genet.* 40, 1166–1174.

- McGregor, L., Makela, V., Darling, S.M., Vrontou, S., Chalepakis, G., Roberts, C., Smart, N., Rutland, P., Prescott, N., Hopkins, J., et al. (2003). Fraser syndrome and mouse blebbed phenotype caused by mutations in FRAS1/Fras1 encoding a putative extracellular matrix protein. *Nat. Genet.* *34*, 203–208.
- McIntyre, B.S., Barlow, N.J. & Foster, P.M. (2001). Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol. Sci.* *62*, 236–249.
- Mefford, H.C., Clauin, S., Sharp, A.J., Moller, R.S., Ullmann, R., Kapur, R., Pinkel, D., Cooper, G.M., Ventura, M., Ropers, H.H., et al. (2007). Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 1057–1069.
- Mefford, H.C., Sharp, A.J., Baker, C., Itsara, A., Jiang, Z., Buysse, K., Huang, S., Maloney, V.K., Crolla, J.A., Baralle, D., et al. (2008). Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N. Engl. J. Med.* *359*, 1685–1699.
- Meglin, A.J., Balotin, R.J., Jelinek, J.S., Fishman, E.K., Jeffs, R.D. & Ghaed, V. (1990). Cloacal exstrophy: radiologic findings in 13 patients. *AJR Am. J. Roentgenol.* *155*, 1267–1272.
- Mehta, V., Abler, L.L., Keil, K.P., Schmitz, C.T., Joshi, P.S. & Vezina, C.M. (2011). Atlas of Wnt and R-spondin gene expression in the developing male mouse lower urogenital tract. *Dev. Dyn.* *240*, 2548–2560.
- Mejía-Baltodano, G., Bobadilla, L., Gonzalez, R.M. & Barros-Núñez, P. (1997). High recurrence of recombinants in a family with pericentric inversion of chromosome 18. *Ann. Genet.* *40*, 164–168.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 31–46.
- Meyer, L.R., Zweig, A.S., Hinrichs, A.S., Karolchik, D., Kuhn, R.M., Wong, M., Sloan, C.A., Rosenbloom, K.R., Roe, G., Rhead, B., et al. (2013). The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013. *Nucleic Acids Res.* *41*, D64–69.
- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. & Falkow, S. (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* *127*, 1529–1537.
- Millar, A.J., Forootan, H. & Rode, H. (2001). An adriamycin experimental rat model inducing a wide variety of abnormalities similar to VACTERL association in humans is now well established. *Pediatr. Surg. Int.* *17*, 502.
- Miller, E.A., Manning, S.E., Rasmussen, S.A., Reefhuis, J. & Honein, M.A. (2009). Maternal exposure to tobacco smoke, alcohol and caffeine, and risk of anorectal atresia: National Birth Defects Prevention Study 1997–2003. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* *23*, 9–17.
- Mills, R.E., Walter, K., Stewart, C., Handsaker, R.E., Chen, K., Alkan, C., Abyzov, A., Yoon, S.C., Ye, K., Cheetham, R.K., et al. (2011). Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* *470*, 59–65.
- Mittal, A., Airon, R.K., Magu, S., Rattan, K.N. & Ratan, S.K. (2004). Associated anomalies with anorectal malformation (ARM). *Indian J. Pediatr.* *71*, 509–514.
- Mo, R., Kim, J.H., Zhang, J., Chiang, C., Hui, C.C. & Kim, P.C. (2001). Anorectal malformations caused by defects in sonic hedgehog signaling. *Am. J. Pathol.* *159*, 765–774.

- Moon, A.M., Guris, D.L., Seo, J., Li, L., Hammond, J., Talbot, A. & Imamoto, A. (2006). Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes. *Dev. Cell* 10, 71–80.
- Muecke, E.C. (1964). The role of the cloacal membrane in exstrophy: the first successful experimental study. *J. Urol.* 92, 659–667.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155, 335–350.
- Murphy, F., Puri, P., Hutson, J.M. & Holschneider, A.M. (2006). Incidence and Frequency of Different Types, and Classification of Anorectal Malformations. In *Anorectal Malformations in Children*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 163–184.
- Musumeci, L., Arthur, J.W., Cheung, F.S.G., Hoque, A., Lippman, S. & Reichardt, J.K.V. (2010). Single nucleotide differences (SNDs) in the dbSNP database may lead to errors in genotyping and haplotyping studies. *Hum. Mutat.* 31, 67–73.
- Nagai, T., Katoh, R., Hasegawa, T., Ohashi, H. & Fukushima, Y. (1994). Currarino triad (anorectal malformation, sacral bony abnormality and presacral mass) with partial trisomy of chromosomes 13q and 20p. *Clin. Genet.* 45, 272–273.
- Nakata, M., Takada, Y., Hishiki, T., Saito, T., Terui, K., Sato, Y., Koseki, H. & Yoshida, H. (2009). Induction of Wnt5a-expressing mesenchymal cells adjacent to the cloacal plate is an essential process for its proximodistal elongation and subsequent anorectal development. *Pediatr. Res.* 66, 149–154.
- Ng, P.C. & Kirkness, E.F. (2010). Whole genome sequencing. *Methods Mol. Biol.* 628, 215–226.
- Ng, S.B., Bigham, A.W., Buckingham, K.J., Hannibal, M.C., McMillin, M.J., Gildersleeve, H.I., Beck, A.E., Tabor, H.K., Cooper, G.M., Mefford, H.C., et al. (2010a). Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat. Genet.* 42, 790–793.
- Ng, S.B., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J. & Shendure, J. (2010b). Massively parallel sequencing and rare disease. *Hum. Mol. Genet.* 19, R119–124.
- Ng, S.B., Turner, E.H., Robertson, P.D., Flygare, S.D., Bigham, A.W., Lee, C., Shaffer, T., Wong, M., Bhattacharjee, A., Eichler, E.E., et al. (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461, 272–276.
- Nicholls, G. & Duffy, P.G. (1998). Anatomical correction of the exstrophy-epispadias complex: analysis of 34 patients. *Br J. Urol.* 82, 865–869.
- Nie, D., Liu, Y. & Xiang, Y. (2011). Overexpression a novel zebra fish spermatogenesis-associated gene 17 (SPATA17) induces apoptosis in GC-1 cells. *Mol. Biol. Rep.* 38, 3945–3952.
- Niederreither, K., Abu-Abed, S., Schuhbaur, B., Petkovich, M., Chambon, P. & Dollé, P. (2002). Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat. Genet.* 31, 84–88.
- Nievelstein, R.A., van der Werff, J.F., Verbeek, F.J., Valk, J. & Vermeij-Keers, C. (1998). Normal and abnormal embryonic development of the anorectum in human embryos. *Teratology* 57, 70–78.
- Nikopoulos, K., Gilissen, C., Hoischen, A., van Nouhuys, C.E., Boonstra, F.N., Blokland, E.A.W., Arts, P., Wieskamp, N., Strom, T.M., Ayuso, C., et al. (2010). Next-generation sequencing of a 40 Mb linkage interval reveals TSPAN12 mutations in patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 240–247.

- Nunn, I.N. & Stephens, F.D. (1961). The triad syndrome: a composite anomaly of the abdominal wall, urinary system and testes. *J. Urol.* *86*, 782–794.
- Nyrén, P. & Lundin, A. (1985). Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal. Biochem.* *151*, 504–509.
- O'Donnell, L., Soileau, B., Heard, P., Carter, E., Sebold, C., Gelfond, J., Hale, D.E. & Cody, J.D. (2010). Genetic determinants of autism in individuals with deletions of 18q. *Hum. Genet.* *128*, 155–164.
- O'Rahilly, R. (1979). Early human development and the chief sources of information on staged human embryos. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *9*, 273–280.
- Ohashi, H., Nishimoto, H., Nishimura, J., Sato, M., Imaizumi, S., Aihara, T. & Fukushima, Y. (1993). Anorectal anomaly in Pfeiffer syndrome. *Clin. Dysmorphol.* *2*, 28–33.
- Olshen, A.B., Venkatraman, E.S., Lucito, R. & Wigler, M. (2004). Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics* *5*, 557–572.
- Van Ommen, G.-J.B. (2005). Frequency of new copy number variation in humans. *Nat. Genet.* *37*, 333–334.
- Orioli, I.M. & Castilla, E.E. (2000). Epidemiological assessment of misoprostol teratogenicity. *BJOG* *107*, 519–523.
- Ou, Z., Berg, J.S., Yonath, H., Enciso, V.B., Miller, D.T., Picker, J., Lenzi, T., Keegan, C.E., Sutton, V.R., Belmont, J., et al. (2008). Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genet. Med.* *10*, 267–277.
- Pagon, R.A., Smith, D.W. & Shepard, T.H. (1979). Urethral obstruction malformation complex: a cause of abdominal muscle deficiency and the “prune belly.” *J. Pediatr.* *94*, 900–906.
- Papapetrou, C., Drummond, F., Reardon, W., Winter, R., Spitz, L. & Edwards, Y.H. (1999). A genetic study of the human T gene and its exclusion as a major candidate gene for sacral agenesis with anorectal atresia. *J. Med. Genet.* *36*, 208–213.
- Park, W.J., Meyers, G.A., Li, X., Theda, C., Day, D., Orlow, S.J., Jones, M.C. & Jabs, E.W. (1995a). Novel FGFR2 mutations in Crouzon and Jackson-Weiss syndromes show allelic heterogeneity and phenotypic variability. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 1229–1233.
- Park, W.J., Theda, C., Maestri, N.E., Meyers, G.A., Fryburg, J.S., Dufresne, C., Cohen, M.M., Jr & Jabs, E.W. (1995b). Analysis of phenotypic features and FGFR2 mutations in Apert syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *57*, 321–328.
- Parker, R.W. (1895). Absence of abdominal muscles in an infant. *The Lancet* *145*, 1252.
- Pathak, N., Austin, C.A. & Drummond, I.A. (2011). Tubulin tyrosine ligase-like genes *ttl3* and *ttl6* maintain zebrafish cilia structure and motility. *J. Biol. Chem.* *286*, 11685–11695.
- Paylor, R., Glaser, B., Mupo, A., Ataliotis, P., Spencer, C., Sobotka, A., Sparks, C., Choi, C.-H., Oghalai, J., Curran, S., et al. (2006). *Tbx1* haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 7729–7734.
- Peiffer, D. a, Le, J.M., Steemers, F.J., Chang, W., Jenniges, T., Garcia, F., Haden, K., Li, J., Shaw, C. a, Belmont, J., et al. (2006). High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Research* *16*, 1136–1148.
- Peña, A. (2004). Comments on anterior ectopic anus. *Pediatr. Surg. Int.* *20*, 902.



- Penington, E.C. & Hutson, J.M. (2003). The absence of lateral fusion in cloacal partition. *J. Pediatr. Surg.* 38, 1287–1295.
- Perry, G.H., Ben-Dor, A., Tsalenko, A., Sampas, N., Rodriguez-Revenga, L., Tran, C.W., Scheffer, A., Steinfeld, I., Tsang, P., Yamada, N.A., et al. (2008). The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 685–695.
- Pfeiffer, R.A., Rinnert, S., Popp, R. & Röckelein, G. (1996). Asymmetrical coronal synostosis, cutaneous syndactyly of the fingers and toes, and jejunal atresia in a male infant. *Am. J. Med. Genet.* 63, 175–176.
- Pfendner, E., Rouan, F. & Uitto, J. (2005). Progress in epidermolysis bullosa: the phenotypic spectrum of plectin mutations. *Exp. Dermatol.* 14, 241–249.
- Pinette, M.G., Pan, Y.Q., Pinette, S.G., Stubblefield, P.G. & Blackstone, J. (1996). Prenatal diagnosis of fetal bladder and cloacal exstrophy by ultrasound. A report of three cases. *J. Reprod. Med.* 41, 132–134.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 2934–2938.
- Pinto, D., Marshall, C., Feuk, L. & Scherer, S.W. (2007). Copy-number variation in control population cohorts. *Hum. Mol. Genet.* 16 *Spec No. 2*, R168–173.
- Pomper, J.K., Wilhelm, H., Tayebati, S.K., Asmus, F., Schüle, R., Sievert, K.-D., Haensch, C.-A., Melms, A. & Haarmeier, T. (2011). A novel clinical syndrome revealing a deficiency of the muscarinic M3 receptor. *Neurology* 76, 451–455.
- Portnoï, M.-F. (2009). Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* 52, 88–93.
- Pownall, M.E.M.E. & Isaacs, H.V.H.V. (2010). *FGF Signalling in Vertebrate Development* (San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences).
- Prieto, J.C., Garcia, N.M., Elder, F.F., Zinn, A.R. & Baker, L.A. (2007). Phenotypic expansion of the supernumerary derivative (22) chromosome syndrome: VACTERL and Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* 42, 1928–1932.
- Przylepa, K.A., Paznekas, W., Zhang, M., Golabi, M., Bias, W., Bamshad, M.J., Carey, J.C., Hall, B.D., Stevenson, R., Orlow, S., et al. (1996). Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Nat. Genet.* 13, 492–494.
- Pussegoda, K.A. (2010). Exome sequencing: locating causative genes in rare disorders. *Clin. Genet.* 78, 32–33.
- Van der Put, N.M., Steegers-Theunissen, R.P., Frosst, P., Trijbels, F.J., Eskes, T.K., van den Heuvel, L.P., Mariman, E.C., den Heyer, M., Rozen, R. & Blom, H.J. (1995). Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 346, 1070–1071.
- Van der Putte, S.C. (1986). Normal and abnormal development of the anorectum. *J. Pediatr. Surg.* 21, 434–440.
- Van der Putte, S.C.J. (2005). The development of the perineum in the human. A comprehensive histological study with a special reference to the role of the stromal components. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 177, 1–131.

- Qi, B.Q., Beasley, S.W. & Frizelle, F.A. (2002). Clarification of the processes that lead to anorectal malformations in the ETU-induced rat model of imperforate anus. *J. Pediatr. Surg.* 37, 1305–1312.
- Quan, L. & Smith, D.W. (1973). The VATER association. Vertebral defects, Anal atresia, T-E fistula with esophageal atresia, Radial and Renal dysplasia: a spectrum of associated defects. *J. Pediatr.* 82, 104–107.
- Rabinowitz, R. & Schillinger, J.F. (1977). Prune belly syndrome in the female subject. *J. Urol.* 118, 454–456.
- Raboch, J. (1975). Incidence of hypospadias and epispadias in chromatin-positive men. *Andrologia* 7, 237–239.
- Railo, A., Nagy, I.I., Kilpeläinen, P. & Vainio, S. (2008). Wnt-11 signaling leads to down-regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin, JNK/AP-1 and NF- $\kappa$ B pathways and promotes viability in the CHO-K1 cells. *Exp. Cell Res.* 314, 2389–2399.
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., Fiegler, H., Shapero, M.H., Carson, A.R., Chen, W., et al. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444, 444–454.
- Rehman, A.U., Morell, R.J., Belyantseva, I.A., Khan, S.Y., Boger, E.T., Shahzad, M., Ahmed, Z.M., Riazuddin, S., Khan, S.N., Riazuddin, S., et al. (2010). Targeted capture and next-generation sequencing identifies C9orf75, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 378–388.
- Reinberg, Y., Shapiro, E., Manivel, J.C., Manley, C.B., Pettinato, G. & Gonzalez, R. (1991). Prune belly syndrome in females: a triad of abdominal musculature deficiency and anomalies of the urinary and genital systems. *J. Pediatr.* 118, 395–398.
- Reutter, H., Becker, T., Ludwig, M., Schäfer, N., Detlefsen, B., Beaudoin, S., Fisch, M., Ebert, A.-K., Rösch, W., Nöthen, M.M., et al. (2006a). Family-based association study of the MTHFR polymorphism C677T in the bladder-exstrophy-epispadias-complex. *Am. J. Med. Genet. A* 140, 2506–2509.
- Reutter, H., Betz, R.C., Ludwig, M. & Boemers, T.M. (2006b). MTHFR 677 TT genotype in a mother and her child with Down syndrome, atrioventricular canal and exstrophy of the bladder: implications of a mutual genetic risk factor? *Eur. J. Pediatr.* 165, 566–568.
- Reutter, H., Bökenkamp, A., Ebert, A.-K., Rösch, W., Boemers, T.M., Nöthen, M.M. & Ludwig, M. (2009). Possible association of Down syndrome and exstrophy-epispadias complex: report of two new cases and review of the literature. *Eur. J. Pediatr.* 168, 881–883.
- Reutter, H., Boyadjiev, S.A., Gambhir, L., Ebert, A.-K., Rösch, W.H., Stein, R., Schröder, A., Boemers, T.M., Bartels, E., Vogt, H., et al. (2011). Phenotype Severity in the Bladder Exstrophy-Epispadias Complex: Analysis of Genetic and Nongenetic Contributing Factors in 441 Families from North America and Europe. *J. Pediatr.* 159, 825–831.e1.
- Reutter, H., Qi, L., Gearhart, J.P., Boemers, T., Ebert, A.-K., Rösch, W., Ludwig, M. & Boyadjiev, S.A. (2007). Concordance analyses of twins with bladder exstrophy-epispadias complex suggest genetic etiology. *Am. J. Med. Genet. A* 143A, 2751–2756.
- Reutter, H., Rüschenhoff, F., Mattheisen, M., Draaken, M., Bartels, E., Hübner, N., Hoffmann, P., Payabvash, S., Saar, K., Nöthen, M.M., et al. (2010). Evidence for linkage of the bladder exstrophy-epispadias complex on chromosome 4q31.21-22 and 19q13.31-41 from a consanguineous Iranian family. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 88, 757–761.

- Reutter, H., Shapiro, E. & Gruen, J.R. (2003). Seven new cases of familial isolated bladder exstrophy and epispadias complex (BEEC) and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. A* 120A, 215–221.
- Reutter, H., Thauvin-Robinet, C., Boemers, T.M., Rösch, W.H. & Ludwig, M. (2006c). Bladder exstrophy-epispadias complex: Investigation of suppressor of variegation, enhancer of zeste and Trithorax (SET) as a candidate gene in a large cohort of patients. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 40, 221–224.
- Rich, M.A., Brock, W.A. & Peña, A. (1988). Spectrum of genitourinary malformations in patients with imperforate anus. *Pediatr. Surg. Int.* 3, 110–113.
- Risch, N. (2001). The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 733–741.
- Roach, J.C., Glusman, G., Smit, A.F.A., Huff, C.D., Hubley, R., Shannon, P.T., Rowen, L., Pant, K.P., Goodman, N., Bamshad, M., et al. (2010). Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing. *Science* 328, 636–639.
- Roberts, D., Sweeney, E. & Walkinshaw, S. (2001). Congenital cystic adenomatoid malformation of the lung coexisting with recombinant chromosome 18. A case report. *Fetal. Diagn. Ther.* 16, 65–67.
- Robin, N.H., Neidich, J.A., Bason, L.D., Whitaker, L.A., McDonald-McGinn, D., Hunter, J., Snyder, H.M., 3rd & Zackai, E.H. (1996). Frontonasal malformation and cloacal exstrophy: a previously unreported association. *Am. J. Med. Genet.* 61, 75–78.
- Rodríguez, L., Liehr, T., Mrasek, K., Mansilla, E., Martínez-Fernández, M.L., Garcia, A. & Martínez-Frías, M.L. (2007). Small supernumerary chromosome marker generating complete and pure trisomy 18p, characterized by molecular cytogenetic techniques and review. *Am. J. Med. Genet. A* 143A, 2727–2732.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M. & Nyrén, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242, 84–89.
- Van Rooij, I.A.L.M., Wijers, C.H.W., Rieu, P.N.M.A., Hendriks, H.S., Brouwers, M.M., Knoers, N.V., de Blaauw, I. & Roeleveld, N. (2010). Maternal and paternal risk factors for anorectal malformations: A Dutch case-control study. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 88, 152–158.
- Rosa, R.F.M., Mombach, R., Zen, P.R.G., Graziadio, C. & Paskulin, G.A. (2010). Clinical characteristics of a sample of patients with cat eye syndrome. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 56, 462–465.
- Ross, A.J., Ruiz-Perez, V., Wang, Y., Hagan, D.M., Scherer, S., Lynch, S.A., Lindsay, S., Custard, E., Belloni, E., Wilson, D.I., et al. (1998). A homeobox gene, HLXB9, is the major locus for dominantly inherited sacral agenesis. *Nat. Genet.* 20, 358–361.
- Rotmensch, S., Liberati, M., Luo, J.S., Tallini, G., Mahoney, M.J. & Hobbins, J.C. (1991). Prenatal diagnosis of a fetus with terminal deletion of chromosome 1 (q41). *Prenat. Diagn.* 11, 867–873.
- Routh, J.C., Huang, L., Retik, A.B. & Nelson, C.P. (2010). Contemporary epidemiology and characterization of newborn males with prune belly syndrome. *Urology* 76, 44–48.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354.
- Salihu, H.M., Tchuinguem, G., Aliyu, M.H. & Kouam, L. (2003). Prune belly syndrome and associated malformations. A 13-year experience from a developing country. *West Indian Med. J.* 52, 281–284.
- Sanders, S.J., Ercan-Sencicek, A.G., Hus, V., Luo, R., Murtha, M.T., Moreno-De-Luca, D., Chu, S.H., Moreau, M.P., Gupta, A.R., Thomson, S.A., et al. (2011). Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* 70, 863–885.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Santulli, T.V., Schullinger, J.N. & Amoury, R.A. (1965). Malformations of the anus and rectum. *Surg. Clin. North Am.* 45, 1253–1271.
- Schaefer, F., Anderson, C., Can, B. & Say, B. (1998). Novel mutation in the FGFR2 gene at the same codon as the Crouzon syndrome mutations in a severe Pfeiffer syndrome type 2 case. *Am. J. Med. Genet.* 75, 252–255.
- Schinzel, A., Schmid, W., Auf der Maur, P., Moser, H., Degenhardt, K.H., Geisler, M. & Grubisic, A. (1981). Incomplete trisomy 22. I. Familial 11/22 translocation with 3:1 meiotic disjunction. Delineation of a common clinical picture and report of nine new cases from six families. *Hum. Genet.* 56, 249–262.
- Schmermund, A., Möhlenkamp, S., Stang, A., Grönemeyer, D., Seibel, R., Hirche, H., Mann, K., Siffert, W., Lauterbach, K., Siegrist, J., et al. (2002). Assessment of clinically silent atherosclerotic disease and established and novel risk factors for predicting myocardial infarction and cardiac death in healthy middle-aged subjects: rationale and design of the Heinz Nixdorf RECALL Study. Risk Factors, Evaluation of Coronary Calcium and Lifestyle. *Am. Heart J.* 144, 212–218.
- Schneider, T., Hein, P., Michel-Reher, M.B. & Michel, M.C. (2005). Effects of ageing on muscarinic receptor subtypes and function in rat urinary bladder. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372, 71–78.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F. & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30, e57.
- Schramm, C., Draaken, M., Bartels, E., Boemers, T.M., Schmiedeke, E., Grasshoff-Derr, S., Märzheuser, S., Hosie, S., Holland-Cunz, S., Baudisch, F., et al. (2011). De novo duplication of 18p11.21-18q12.1 in a female with anorectal malformation. *Am. J. Med. Genet. A* 155, 445–449.
- Schwarz, J.M., Rödelberger, C., Schuelke, M. & Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat. Methods* 7, 575–576.

- Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., Yamrom, B., Yoon, S., Krasnitz, A., Kendall, J., et al. (2007). Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316, 445–449.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P., Månér, S., Massa, H., Walker, M., Chi, M., et al. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305, 525–528.
- Senapathy, P., Bhasi, A., Mattox, J., Dhandapany, P.S. & Sadayappan, S. (2010). Targeted genome-wide enrichment of functional regions. *PLoS ONE* 5, e11138.
- Senechal, K., Halpern, J. & Sawyers, C.L. (1996). The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the BCR-ABL oncogene. *J. Biol. Chem.* 271, 23255–23261.
- Seri, M., Martucciello, G., Paleari, L., Bolino, A., Priolo, M., Salemi, G., Forabosco, P., Caroli, F., Cusano, R., Tocco, T., et al. (1999). Exclusion of the Sonic Hedgehog gene as responsible for Currarino syndrome and anorectal malformations with sacral hypodevelopment. *Hum. Genet.* 104, 108–110.
- Shaikh, T.H., O'Connor, R.J., Pierpont, M.E., McGrath, J., Hacker, A.M., Nimmakayalu, M., Geiger, E., Emanuel, B.S. & Saitta, S.C. (2007). Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Genome Res.* 17, 482–491.
- Shakirova, Y., Mori, M., Ekman, M., Erjefält, J., Uvelius, B. & Swärd, K. (2010). Human urinary bladder smooth muscle is dependent on membrane cholesterol for cholinergic activation. *Eur. J. Pharmacol.* 634, 142–148.
- Shanske, A.L., Pande, S., Aref, K., Vega-Rich, C., Brion, L., Reznik, S. & Timor-Tritsch, I.E. (2003). Omphalocele-exstrophy-imperforate anus-spinal defects (OEIS) in triplet pregnancy after IVF and CVS. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 67, 467–471.
- Shapiro, E., Lepor, H. & Jeffs, R.D. (1984). The inheritance of the exstrophy-epispadias complex. *J. Urol.* 132, 308–310.
- Sharp, A.J., Mefford, H.C., Li, K., Baker, C., Skinner, C., Stevenson, R.E., Schroer, R.J., Novara, F., De Gregori, M., Ciccone, R., et al. (2008). A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat. Genet.* 40, 322–328.
- Sharp, P.A., Sugden, B. & Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055–3063.
- Shaw, J.L.V. & Diamandis, E.P. (2007). Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin. Chem.* 53, 1423–1432.
- Shaw, R.A., Smyth, J. & Pringle, K. (1990). The prune belly syndrome in a female. *Pediatr. Surg. Int.* 5, 202–207.
- Shelling, A.N. & Ferguson, L.R. (2007). Genetic variation in human disease and a new role for copy number variants. *Mutat. Res.* 622, 33–41.
- Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D. & Church, G.M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728–1732.
- Shifley, E.T. & Cole, S.E. (2007). The vertebrate segmentation clock and its role in skeletal birth defects. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 81, 121–133.

- Shprintzen, R.J., Goldberg, R.B., Lewin, M.L., Sidoti, E.J., Berkman, M.D., Argamaso, R.V. & Young, D. (1978). A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J.* 15, 56–62.
- Siffel, C., Correa, A., Amar, E., Bakker, M.K., Bermejo-Sánchez, E., Bianca, S., Castilla, E.E., Clementi, M., Cocchi, G., Csáky-Szunyogh, M., et al. (2011). Bladder exstrophy: An epidemiologic study from the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research, and an overview of the literature. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 157C, 321–332.
- Simon-Sanchez, J., Scholz, S., Fung, H.-C., Matarin, M., Hernandez, D., Gibbs, J.R., Britton, A., de Vrieze, F.W., Peckham, E., Gwinn-Hardy, K., et al. (2007). Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1–14.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B. & Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321, 674–679.
- Sobreira, N.L.M., Cirulli, E.T., Avramopoulos, D., Wohler, E., Oswald, G.L., Stevens, E.L., Ge, D., Shianna, K.V., Smith, J.P., Maia, J.M., et al. (2010). Whole-genome sequencing of a single proband together with linkage analysis identifies a Mendelian disease gene. *PLoS Genet.* 6, e1000991.
- Soemedi, R., Wilson, I.J., Bentham, J., Darlay, R., Töpf, A., Zelenika, D., Cosgrove, C., Setchfield, K., Thornborough, C., Granados-Riveron, J., et al. (2012). Contribution of Global Rare Copy-Number Variants to the Risk of Sporadic Congenital Heart Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 489–501.
- Southard, A.E., Edelmann, L.J. & Gelb, B.D. (2012). Role of copy number variants in structural birth defects. *Pediatrics* 129, 755–763.
- Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105–109.
- Spouge, D. & Baird, P.A. (1986). Imperforate anus in 700,000 consecutive liveborn infants. *Am. J. Med. Genet.* 25, 151–161.
- Stec, A.A. (2011). Embryology and bony and pelvic floor anatomy in the bladder exstrophy-epispadias complex. *Semin. Pediatr. Surg.* 20, 66–70.
- Steggmaier, M., Yang, B., Yoo, J.S., Huang, B., Shen, M., Yu, S., Luo, Y. & Scheller, R.H. (1998). Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. *J. Biol. Chem.* 273, 34171–34179.
- Steemers, F.J., Chang, W., Lee, G., Barker, D.L., Shen, R. & Gunderson, K.L. (2006). Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nat. Methods* 3, 2005–2007.
- Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietiläinen, O.P.H., Ingason, A., Steinberg, S., Fossdal, R., Sigurdsson, E., Sigmundsson, T., Buizer-Voskamp, J.E., et al. (2008). Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 455, 232–236.
- Stephens, F.D. (1988). Embryology of the cloaca and embryogenesis of anorectal malformations. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 24, 177–209.
- Stephens, F.D. & Smith, E.D. (1971). *Ano-rectal malformations in children*, (Chicago: Year Book Medical Publishers).
- Stoll, C., Alembik, Y., Dott, B. & Roth, M.P. (2007). Associated malformations in patients with anorectal anomalies. *Eur. J. Med. Genet.* 50, 281–290.

- Sudmant, P.H., Kitzman, J.O., Antonacci, F., Alkan, C., Malig, M., Tsalenko, A., Sampas, N., Bruhn, L., Shendure, J. & Eichler, E.E. (2010). Diversity of Human Copy Number Variation and Multicopy Genes. *Science* 330, 641–646.
- Sudo, Y., Numakura, C., Abe, A., Aiba, S., Matsunaga, A. & Hayasaka, K. (2010). Phenotypic variability in a family with Townes-Brocks syndrome. *J. Hum. Genet.* 55, 550–551.
- Sun, W., Wright, F.A., Tang, Z., Nordgard, S.H., Van Loo, P., Yu, T., Kristensen, V.N. & Perou, C.M. (2009). Integrated study of copy number states and genotype calls using high-density SNP arrays. *Nucleic Acids Res.* 37, 5365–5377.
- Sutherland, R.S., Mevorach, R.A. & Kogan, B.A. (1995). The prune-belly syndrome: current insights. *Pediatr. Nephrol.* 9, 770–778.
- Swaminathan, G.J., Bragin, E., Chatzimichali, E.A., Corpas, M., Bevan, A.P., Wright, C.F., Carter, N.P., Hurles, M.E. & Firth, H.V. (2012). DECIPHER: web-based, community resource for clinical interpretation of rare variants in developmental disorders. *Hum. Mol. Genet.* 21, R37–44.
- Szatmari, P., Paterson, A.D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X.-Q., Vincent, J.B., Skaug, J.L., Thompson, A.P., Senman, L., et al. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat. Genet.* 39, 319–328.
- Tai, C.C., Sala, F.G., Ford, H.R., Wang, K.S., Li, C., Minoo, P., Grikscheit, T.C. & Bellusci, S. (2009). Wnt5a knock-out mouse as a new model of anorectal malformation. *J. Surg. Res.* 156, 278–282.
- Tan, T.Y., Gordon, C.T., Amor, D.J. & Farlie, P.G. (2010). Developmental perspectives on copy number abnormalities of the 22q11.2 region. *Clin. Genet.* 78, 201–218.
- Tank, E.S. & Lindenauer, S.M. (1970). Principles of management of exstrophy of the cloaca. *Am. J. Surg.* 119, 95–98.
- Temtamy, S.A. & Miller, J.D. (1974). Extending the scope of the VATER association: definition of the VATER syndrome. *J. Pediatr.* 85, 345–349.
- Terada, S., Suzuki, N., Uchida, K., Ueno, H. & Akasofu, K. (1994). Etiology of prune belly syndrome: evidence of megalocystic origin in an early fetus. *Obstet. Gynecol.* 83, 865–868.
- Teyssier, J.R. & Bajolle, F. (1980). Duplication-deficiency of chromosome 18, resulting from recombination of a paternal pericentric inversion, with a note for genetic counselling. *Hum. Genet.* 53, 195–200.
- Thauvin-Robinet, C., Faivre, L., Cusin, V., Khau Van Kien, P., Callier, P., Parker, K.L., Fellous, M., Borgnon, J., Gounot, E., Huet, F., et al. (2004). Cloacal exstrophy in an infant with 9q34.1-qter deletion resulting from a de novo unbalanced translocation between chromosome 9q and Yq. *Am. J. Med. Genet. A* 126A, 303–307.
- Thienpont, B., Breckpot, J., Vermeesch, J.R., Gewillig, M. & Devriendt, K. (2008). A complex submicroscopic chromosomal imbalance in 19p13.11 with one microduplication and two microtriplications. *Eur. J. Med. Genet.* 51, 219–225.
- Tonni, G., Ida, V., Alessandro, V. & Bonasoni, M.P. (2012). Prune-Belly Syndrome: Case Series and Review of the Literature Regarding Early Prenatal Diagnosis, Epidemiology, Genetic Factors, Treatment, and Prognosis. *Fetal Pediatr. Pathol.* 31, 13–24.
- Torres-Juan, L., Rosell, J., Morla, M., Vidal-Pou, C., García-Algas, F., de la Fuente, M.-A., Juan, M., Tubau, A., Bachiller, D., Bernues, M., et al. (2007). Mutations in TBX1 genocopy the 22q11.2

- deletion and duplication syndromes: a new susceptibility factor for mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 658–663.
- Trichet, V., Ruault, M., Roizès, G. & De Sario, A. (2000). Characterization of the human tubulin tyrosine ligase-like 1 gene (TTLL1) mapping to 22q13.1. *Gene* **257**, 109–117.
- Turleau, C., Chavin-Colin, F., Narbouton, R., Asensi, D. & de Grouchy, J. (1980). Trisomy 18q-. Trisomy mapping of chromosome 18 revisited. *Clin. Genet.* **18**, 20–26.
- Tuzun, E., Sharp, A.J., Bailey, J.A., Kaul, R., Morrison, V.A., Pertz, L.M., Haugen, E., Hayden, H., Albertson, D., Pinkel, D., et al. (2005). Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat. Genet.* **37**, 727–732.
- Uji, S., Kurokawa, T., Hashimoto, H., Kasuya, T. & Suzuki, T. (2011). Embryonic staging of fugu, *Takifugu rubripes*, and expression profiles of *aldh1a2*, *aldh1a3* and *cyp26a1*. *Dev. Growth Differ.* **53**, 715–725.
- Utsch, B., DiFeo, A., Kujat, A., Karle, S., Schuster, V., Lenk, H., Jacobs, U., Müller, M., Dötsch, J., Rascher, W., et al. (2006). Bladder exstrophy and Epstein type congenital macrothrombocytopenia: evidence for a common cause? *Am. J. Med. Genet. A* **140**, 2251–2253.
- Uysal-Onganer, P. & Kypta, R.M. (2012). Wnt11 in 2011 - the regulation and function of a non-canonical Wnt. *Acta Physiol. (Oxf)* **204**, 52–64.
- Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., Zeng, K., Malek, J.A., Costa, G., McKernan, K., et al. (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res.* **18**, 1051–1063.
- Van de Ven, C., Bialecka, M., Neijts, R., Young, T., Rowland, J.E., Stringer, E.J., Van Rooijen, C., Meijlink, F., Nóvoa, A., Freund, J.-N., et al. (2011). Concerted involvement of *Cdx/Hox* genes and Wnt signaling in morphogenesis of the caudal neural tube and cloacal derivatives from the posterior growth zone. *Development* **138**, 3451–3462.
- Vermeij-Keers, C., Hartwig, N.G. & van der Werff, J.F. (1996). Embryonic development of the ventral body wall and its congenital malformations. *Semin. Pediatr. Surg.* **5**, 82–89.
- Vermeulen, S.J., Speleman, F., Vanransbeeck, L., Verspeet, J., Menten, B., Verschraegen-Spae, M.-R., Wilde, P.D., Messiaen, L., Michaelis, R.C. & Leroy, J.G. (2005). Familial pericentric inversion of chromosome 18: behavioral abnormalities in patients heterozygous for either the *dup(18p)/del(18q)* or *dup(18q)/del(18p)* recombinant chromosome. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 52–58.
- Vermot, J., Niederreither, K., Garnier, J.-M., Chambon, P. & Dollé, P. (2003). Decreased embryonic retinoic acid synthesis results in a DiGeorge syndrome phenotype in newborn mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 1763–1768.
- Van den Veyver, I.B., Patel, A., Shaw, C.A., Pursley, A.N., Kang, S.-H.L., Simovich, M.J., Ward, P.A., Darilek, S., Johnson, A., Neill, S.E., et al. (2009). Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat. Diagn.* **29**, 29–39.
- Vianna-Morgante, A.M., Nozaki, M.J., Ortega, C.C., Coates, V. & Yamamura, Y. (1976). Partial monosomy and partial trisomy 18 in two offspring of carrier of pericentric inversion of chromosome 18. *J. Med. Genet.* **13**, 366–370.
- Vissers, L.E.L.M., de Ligt, J., Gilissen, C., Janssen, I., Steehouwer, M., de Vries, P., van Lier, B., Arts, P., Wieskamp, N., del Rosario, M., et al. (2010). A de novo paradigm for mental retardation. *Nat. Genet.* **42**, 1109–1112.



- Vo, T.T.B., Jung, E.-M., Dang, V.H., Jung, K., Baek, J., Choi, K.-C. & Jeung, E.-B. (2009). Differential Effects of Flutamide and Di-(2-ethylhexyl) phthalate on Male Reproductive Organs in a Rat Model. *J. Reprod. Dev* 55, 400–411.
- Volpi, L., Roversi, G., Colombo, E.A., Leijsten, N., Concolino, D., Calabria, A., Mencarelli, M.A., Fimiani, M., Macciardi, F., Pfundt, R., et al. (2010). Targeted next-generation sequencing appoints c16orf57 as clericuzio-type poikiloderma with neutropenia gene. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 72–76.
- De Vries, P.A. & Friedland, G.W. (1974). The staged sequential development of the anus and rectum in human embryos and fetuses. *J. Pediatr. Surg.* 9, 755–769.
- Wain, L.V., Armour, J.A.L. & Tobin, M.D. (2009). Genomic copy number variation, human health, and disease. *Lancet* 374, 340–350.
- Wakefield, M.R., Steinbecker, K.M., Krambeck, A.E. & Teague, J.L. (2002). Primary surgical repair of combined gastroschisis and bladder exstrophy. *J. Pediatr. Surg.* 37, 1634–1636.
- Waller, D.K., Shaw, G.M., Rasmussen, S.A., Hobbs, C.A., Canfield, M.A., Siega-Riz, A.-M., Gallaway, M.S. & Correa, A. (2007). Prepregnancy obesity as a risk factor for structural birth defects. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 161, 745–750.
- Walsh, T., McClellan, J.M., McCarthy, S.E., Addington, A.M., Pierce, S.B., Cooper, G.M., Nord, A.S., Kusenda, M., Malhotra, D., Bhandari, A., et al. (2008). Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 320, 539–543.
- Walsh, T., Shahin, H., Elkan-Miller, T., Lee, M.K., Thornton, A.M., Roeb, W., Abu Rayyan, A., Loulus, S., Avraham, K.B., King, M.-C., et al. (2010). Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 90–94.
- Wang, K., Li, M., Hadley, D., Liu, R., Glessner, J., Grant, S.F.A., Hakonarson, H. & Bucan, M. (2007). PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res.* 17, 1665–1674.
- Wangensteen, O.H. & Rice, C.O. (1930). Imperforate anus: A method of determining the surgical approach. *Ann. Surg.* 92, 77–81.
- Waring, M.J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 13, 269–282.
- Weber, S., Mir, S., Schlingmann, K.P., Nürnberg, G., Becker, C., Kara, P.E., Ozkayin, N., Konrad, M., Nürnberg, P. & Schaefer, F. (2005). Gene locus ambiguity in posterior urethral valves/prune-belly syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 20, 1036–1042.
- Weber, S., Thiele, H., Mir, S., Toliat, M.R., Sozeri, B., Reutter, H., Draaken, M., Ludwig, M., Altmüller, J., Frommolt, P., et al. (2011). Muscarinic Acetylcholine Receptor M3 Mutation Causes Urinary Bladder Disease and a Prune-Belly-like Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 668–674.
- Wei, X. & Sulik, K.K. (1993). Pathogenesis of craniofacial and body wall malformations induced by ochratoxin A in mice. *Am. J. Med. Genet.* 47, 862–871.
- Weiss, L.A., Shen, Y., Korn, J.M., Arking, D.E., Miller, D.T., Fossdal, R., Saemundsen, E., Stefansson, H., Ferreira, M.A.R., Green, T., et al. (2008). Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N. Engl. J. Med.* 358, 667–675.
- Wellcome Trust Case Control Consortium (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661–678.

- Wen, J., Chiang, Y.J., Gao, C., Xue, H., Xu, J., Ning, Y., Hodes, R.J., Gao, X. & Chen, Y.-G. (2010). Loss of Dact1 disrupts planar cell polarity signaling by altering dishevelled activity and leads to posterior malformation in mice. *J. Biol. Chem.* *285*, 11023–11030.
- Wentzel, C., Fernström, M., Ohrner, Y., Annerén, G. & Thuresson, A.-C. (2008). Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* *51*, 501–510.
- Wesolowski, J., Caldwell, V. & Paumet, F. (2012). A Novel Function for SNAP29 (Synaptosomal-Associated Protein of 29 kDa) in Mast Cell Phagocytosis. *PLoS ONE* *7*, e49886.
- Wiesel, A., Queisser-Luft, A., Clementi, M., Bianca, S. & Stoll, C. (2005). Prenatal detection of congenital renal malformations by fetal ultrasonographic examination: an analysis of 709,030 births in 12 European countries. *Eur. J. Med. Genet.* *48*, 131–144.
- Wijers, C.H.W., de Blaauw, I., Marcelis, C.L.M., Wijnen, R.M.H., Brunner, H., Midrio, P., Gamba, P., Clementi, M., Jenetzky, E., Zwink, N., et al. (2010). Research perspectives in the etiology of congenital anorectal malformations using data of the International Consortium on Anorectal Malformations: evidence for risk factors across different populations. *Pediatr. Surg. Int.* *26*, 1093–1099.
- Wilkie, A.O.M. (2005). Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 187–203.
- Wilkins, S., Zhang, K.W., Mahfuz, I., Quantin, R., D'Cruz, N., Hutson, J., Ee, M., Bagli, D., Aitken, K., Fong, F.N.-Y., et al. (2012). Insertion/Deletion Polymorphisms in the  $\Delta$ Np63 Promoter Are a Risk Factor for Bladder Exstrophy Epispadias Complex. *PLoS Genet.* *8*, e1003070.
- Wilson, G.N., Heller, K.B., Elterman, R.D. & Schneider, N.R. (1990). Partial trisomy 18 with minimal anomalies: lack of correspondence between phenotypic manifestations and triplicated loci along chromosome 18. *Am. J. Med. Genet.* *36*, 506–510.
- Winchester, L., Yau, C. & Ragoussis, J. (2009). Comparing CNV detection methods for SNP arrays. *Brief Funct. Genomic Proteomic* *8*, 353–366.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. & Rasmussen, R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* *22*, 130–131, 134–138.
- Wladimiroff, J.W., Molenaar, J.C., Niermeijer, M.F., Stewart, P.A. & van Eyck, J. (1983). Prenatal diagnosis and management of omphalocele. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *16*, 19–23.
- Wloga, D., Webster, D.M., Rogowski, K., Bré, M.-H., Levilliers, N., Jerka-Dziadosz, M., Janke, C., Dougan, S.T. & Gaertig, J. (2009). TTLL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev. Cell* *16*, 867–876.
- Wood, H.M., Babineau, D. & Gearhart, J.P. (2007). In vitro fertilization and the cloacal/bladder exstrophy-epispadias complex: a continuing association. *J. Pediatr. Urol.* *3*, 305–310.
- Wood, H.M., Trock, B.J. & Gearhart, J.P. (2003). In vitro fertilization and the cloacal-bladder exstrophy-epispadias complex: is there an association? *J. Urol.* *169*, 1512–1515.
- Wood, J. (1869). On Fission and Extroversion of the Bladder with Epispadias; with the results of eight cases treated by Plastic Operations. *Med. Chir. Trans.* *52*, 85–132.3.
- Woodard, J.R. (1978). The prune belly syndrome. *Urol. Clin. North Am.* *5*, 75–93.
- Wright, J.R., Jr, Barth, R.F., Neff, J.C., Poe, E.T., Sucheston, M.E. & Stempel, L.E. (1986). Gastrointestinal malformations associated with prune belly syndrome: three cases and a review of the literature. *Pediatr. Pathol.* *5*, 421–448.

- Xu, B., Roos, J.L., Levy, S., van Rensburg, E.J., Gogos, J.A. & Karayiorgou, M. (2008). Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat. Genet.* **40**, 880–885.
- Yagi, H., Furutani, Y., Hamada, H., Sasaki, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Ichida, F., Joo, K., Kimura, M., Imamura, S., et al. (2003). Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet* **362**, 1366–1373.
- Yamaguchi, T.P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N. & McMahon, A.P. (1999). T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev.* **13**, 3185–3190.
- Yanagawa, M., Tsukuba, T., Nishioku, T., Okamoto, Y., Okamoto, K., Takii, R., Terada, Y., Nakayama, K.I., Kadowaki, T. & Yamamoto, K. (2007). Cathepsin E deficiency induces a novel form of lysosomal storage disorder showing the accumulation of lysosomal membrane sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal pH in macrophages. *J. Biol. Chem.* **282**, 1851–1862.
- Yang, Y., Chung, E.K., Wu, Y.L., Savelli, S.L., Nagaraja, H.N., Zhou, B., Hebert, M., Jones, K.N., Shu, Y., Kitzmiller, K., et al. (2007). Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 1037–1054.
- Yaplito-Lee, J., Pitt, J., Meijer, J., Zoetekouw, L., Meinsma, R. & van Kuilenburg, A.B.P. (2008). Beta-ureidopropionase deficiency presenting with congenital anomalies of the urogenital and colorectal systems. *Mol. Genet. Metab.* **93**, 190–194.
- Yokoyama, E., Del Castillo, V., Ramos, S. & Angel, A.G.-D. (2007). Omphalocele, bladder exstrophy, imperforate anus, spine defects complex, and bilateral cleft lip and palate in one product of a triplet pregnancy obtained by in vitro fertilization: a case report. *Am. J. Med. Genet. A* **143A**, 1933–1935.
- Yuan, P., Okazaki, I. & Kuroki, Y. (1995). Anal atresia: effect of smoking and drinking habits during pregnancy. *Jpn. J. Hum. Genet.* **40**, 327–332.
- Yucel, S., Liu, W., Cordero, D., Donjacour, A., Cunha, G. & Baskin, L.S. (2004). Anatomical studies of the fibroblast growth factor-10 mutant, Sonic Hedge Hog mutant and androgen receptor mutant mouse genital tubercle. *Adv. Exp. Med. Biol.* **545**, 123–148.
- Zackai, E.H. & Emanuel, B.S. (1980). Site-specific reciprocal translocation, t(11;22) (q23;q11), in several unrelated families with 3:1 meiotic disjunction. *Am. J. Med. Genet.* **7**, 507–521.
- Zaki, M.S., Gillessen-Kaesbach, G., Vater, I., Caliebe, A., Siebert, R., Kamel, A.K., Mohamed, A.M. & Mazen, I. (2012). Bladder exstrophy and extreme genital anomaly in a patient with pure terminal 1q deletion: expansion of phenotypic spectrum. *Eur. J. Med. Genet.* **55**, 43–48.
- Zarghooni, S., Wunsch, J., Bodenbenner, M., Brüggmann, D., Grando, S.A., Schwantes, U., Wess, J., Kummer, W. & Lips, K.S. (2007). Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium. *Life Sci.* **80**, 2308–2313.
- Zhang, F., Gu, W., Hurles, M.E. & Lupski, J.R. (2009a). Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **10**, 451–481.
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *J. Genet. Genomics.* **38**, 95–109.
- Zhang, J., Fu, Y., Zhao, Y., Li, F., Qian, A., Wu, B. & Li-Ling, J. (2009b). [Genetic analysis of genitourinary malformations]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **26**, 134–138.

- Zhang, T., Bai, Y.Z., Wang, D.J., Jia, H.M., Yuan, Z.W. & Wang, W.L. (2009c). Spatiotemporal pattern analysis of transcription factor 4 in the developing anorectum of the rat embryo with anorectal malformations. *Int. J. Colorectal. Dis.* 24, 1039–1047.
- Zogopoulos, G., Ha, K.C.H., Naqib, F., Moore, S., Kim, H., Montpetit, A., Robidoux, F., Laflamme, P., Cotterchio, M., Greenwood, C., et al. (2007). Germ-line DNA copy number variation frequencies in a large North American population. *Hum. Genet.* 122, 345–353.
- Zweier, C., Sticht, H., Aydin-Yaylagül, I., Campbell, C.E. & Rauch, A. (2007). Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 510–517.
- Zwink, N., Jenetzky, E. & Brenner, H. (2011). Parental risk factors and anorectal malformations: systematic review and meta-analysis. *Orphanet J. Rare Dis.* 6, 25.
- Zwink, N., Jenetzky, E., Hirsch, K., Reifferscheid, P., Schmiedeke, E., Schmidt, D., Reckin, S., Obermayr, F., Boemers, T.M., Stein, R., et al. (2012a). Assisted reproductive techniques and the risk of the exstrophy-epispadias complex: a German case-control study. *J. Urol.* 10.1016/j.juro.2012.11.108.
- Zwink, N., Jenetzky, E., Schmiedeke, E., Schmidt, D., Märzheuser, S., Grasshoff-Derr, S., Holland-Cunz, S., Weih, S., Hosie, S., Reifferscheid, P., et al. (2012b). Assisted reproductive techniques and the risk of anorectal malformations: a German case-control study. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 65.

## Eigene Publikationen

- Baudisch, F.\*, **Draaken, M.\***, Bartels, E., Schmiedeke, E., Bagci, S., Bartmann, P., Nöthen, M.M., Ludwig, M. & Reutter, H. (zur Publikation angenommen). CNV analysis in monozygotic twin pairs discordant for urorectal malformations. *Twin. Res. Hum. Genet.*
- Dworschak, G.C., **Draaken, M.**, Hilger, A., Born, M., Reutter, H. & Ludwig, M. (zur Publikation angenommen). An incompletely penetrant novel MAFB (p.Ser56Phe) variant in autosomal dominant multicentric carpotarsal osteolysis syndrome. *Int. J. Mol. Med.*
- Hilger, A., Schramm, S., Pennimpede, T., Wittler, L., Dworschak, G.C., Bartels, E., Engels, H., Zink, A.M., Degenhardt, F., Müller, A.M., Schmiedeke, E., Grasshoff-Derr, S., Märzheuser, S., Hosie, S., Holland-Cunz, S., Wijers, C.H.W., Marcelis, C.L.M., van Rooij, I.A.L.M., Hildebrandt, F., Herrmann, B.G., Nöthen, M.M., Ludwig, M., Reutter, H. & **Draaken, M.** (in Druck). De novo microduplications at 1q41, 2q37.3, and 8q24.3 in patients with VATER/VACTERL association. *Eur. J. Hum. Genet.* (DOI: 10.1038/ejhg.2013.58).
- Draaken, M.\***, Mughal, S.S.\*, Pennimpede, T., Wolter, S., Wittler, L., Ebert, A.K., Rösch, W., Stein, R., Bartels, E., Schmidt, D., Boemers, T.M., Schmiedeke, E., Hoffmann, P., Moebus, S., Herrmann, B.G., Nöthen, M.M., Reutter, H. & Ludwig, M. (2013). Isolated bladder exstrophy associated with a de novo 0.9 Mb microduplication on chromosome 19p13.12. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 97, 133–139.
- Pasternack, S.M., Böckenhauer, D., Refke, M., Tasic, V., **Draaken, M.**, Conrad, C., Born, M., Betz, R.C., Reutter, H. & Ludwig, M. (2013). A Premature Termination Mutation in a Patient with Lowe Syndrome without Congenital Cataracts: Dropping the “O” in OCRL. *Klin. Padiatr.* 225, 29–33.
- Draaken, M.\***, Prins, W.\*, Zeidler, C.\*, Hilger, A., Mughal, S.S., Latus, J., Boemers, T.M., Schmidt, D., Schmiedeke, E., Szychalski, N., Bartels, E., Nöthen, M.M., Reutter, H. & Ludwig, M. (2012). Involvement of the WNT and FGF signaling pathways in non-isolated anorectal malformations: Sequencing analysis of WNT3A, WNT5A, WNT11, DACT1, FGF10, FGFR2 and the T gene. *Int. J. Mol. Med.* 30, 1459–1464.
- Bartels, E.\*, Schulz, A.C.\*, Mora, N.W., Pineda-Alvarez, D.E., Wijers, C.H.W., Marcelis, C.L.M., Stressig, R., Ritgen, J., Schmiedeke, E., Mattheissen, M., **Draaken, M.**, Hoffmann, P., Hilger, C.A., Dworschak, G.C., Baudisch, F., Ludwig, M., Bagci, S., Müller, A., Gembruch, U., Geipel, A., Berg, C., Bartmann, P., Nöthen, M.M., van Rooij, I.A.L.M., Solomon, B.D. & Reutter, H. (2012). VATER/VACTERL association: identification of seven new twin pairs, a systematic review of the literature, and a classical twin analysis. *Clin. Dysmorphol.* 21, 191–195.
- Wittler, L., Hilger, A., Proske, J., Pennimpede, T., **Draaken, M.**, Ebert, A.-K., Rösch, W., Stein, R., Nöthen, M.M., Reutter, H. & Ludwig, M. (2012). Murine expression and

- mutation analyses of the prostate androgen-regulated mucin-like protein 1 (Parm1) gene, a candidate for human epispadias. *Gene* 506, 392–395.
- Spier, I., Horpaopan, S., Vogt, S., Uhlhaas, S., Morak, M., Stienen, D., **Draaken, M.**, Ludwig, M., Holinski-Feder, E., Nöthen, M.M., Hoffmann, P. & Aretz, S. (2012). Deep intronic APC mutations explain a substantial proportion of patients with familial or early-onset adenomatous polyposis. *Hum. Mutat.* 33, 1045–1050.
- Hilger, A., Schramm, C., **Draaken, M.**, Mughal, S.S., Dworschak, G., Bartels, E., Hoffmann, P., Nöthen, M.M., Reutter, H. & Ludwig, M. (2012). Familial occurrence of the VATER/VACTERL association. *Pediatr. Surg. Int.* 28, 725–729.
- Weber, S., Thiele, H., Mir, S., Toliat, M.R., Sozeri, B., Reutter, H., **Draaken, M.**, Ludwig, M., Altmüller, J., Frommolt, P., Stuart, H.M., Ranjzad, P., Hanley, N.A., Jennings, R., Newman, W.G., Wilcox, D.T., Thiel, U., Schlingmann, K.P., Beetz, R., Hoyer, P.F., Konrad, M., Schaefer, F., Nürnberg, P. & Woolf, A.S. (2011). Muscarinic Acetylcholine Receptor M3 Mutation Causes Urinary Bladder Disease and a Prune-Belly-like Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 668–674.
- Schulz, A.C., Bartels, E., Stressig, R., Ritgen, J., Schmiedeke, E., Mattheisen, M., **Draaken, M.**, Ludwig, M., Bagci, S., Müller, A., Gembruch, U., Geipel, A., Berg, C., Heydweiller, A., Bachour, H., Schumacher, J., Bartmann, P., Nöthen, M.M. & Reutter, H. (2012). Nine new twin pairs with esophageal atresia: a review of the literature and performance of a twin study of the disorder. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 94, 182–186.
- Bartels, E., **Draaken, M.**, Kazmierczak, B., Spranger, S., Schramm, C., Baudisch, F., Nöthen, M.M., Schmiedeke, E., Ludwig, M. & Reutter, H. (2011). De novo Partial Trisomy 18p and Partial Monosomy 18q in a Patient with Anorectal Malformation. *Cytogenet. Genome Res.* 134, 243–248.
- Reutter, H., Boyadjiev, S.A., Gambhir, L., Ebert, A.K., Rösch, W.H., Stein, R., Schröder, A., Boemers, T.M., Bartels, E., Vogt, H., Utsch, B., Müller, M., Detlefsen, B., Zwink, N., Rogenhofer, S., Gobet, R., Beckers, G.M., Bökenkamp, A., Kajbafzadeh, A.M., Jaureguizar, E., **Draaken, M.**, Lakshmanan, Y., Gearhart, J.P., Ludwig, M., Nöthen, M.M. & Jenetzky, E. (2011). Phenotype severity in the bladder exstrophy-epispadias complex: analysis of genetic and nongenetic contributing factors in 441 families from North America and Europe. *J. Pediatr.* 159, 825–831.
- Qi, L., Chen, K., Hur, D.J., Yagnik, G., Lakshmanan, Y., Kotch, L.E., Ashrafi, G.H., Martinez-Murillo, F., Kowalski, J., Naydenov, C., Wittler, L., Gearhart, J.P., **Draaken, M.**, Reutter, H., Ludwig, M. & Boyadjiev, S.A. (2011). Genome-wide expression profiling of urinary bladder implicates desmosomal and cytoskeletal dysregulation in the bladder exstrophy-epispadias complex. *Int. J. Mol. Med.* 27, 755–765.
- Schramm, C., **Draaken, M.**, Tewes, G., Bartels, E., Schmiedeke, E., Märzheuser, S., Grasshoff-Derr, S., Hosie, S., Holland-Cunz, S., Priebe, L., Kreiss-Nachtsheim, M., Hoffmann, P., Aretz, S., Nöthen, M.M., Reutter, H. & Ludwig, M. (2011). Autosomal-dominant non-syndromic anal atresia: sequencing of candidate genes, array-based molecular karyotyping, and review of the literature. *Eur. J. Pediatr.* 170, 741–746.

- Draaken, M.**, Giesen, C.A., Kesselheim, A.L., Jabs, R., Aretz, S., Kugaud, M., Chrzanowska, K.H., Krajewska-Walasek, M. & Ludwig, M. (2011). Maternal de novo triple mosaicism for two single OCRL nucleotide substitutions (c.1736A>T, c.1736A>G) in a Lowe syndrome family. *Hum. Genet.* 129, 513–519.
- Schramm, C.\*, **Draaken, M.\***, Bartels, E., Boemers, T.M., Schmiedeke, E., Grasshoff-Derr, S., Märzheuser, S., Hosie, S., Holland-Cunz, S., Baudisch, F., Priebe, L., Hoffmann, P., Zink, A.M., Engels, H., Brockschmidt, F.F., Aretz, S., Nöthen, M.M., Ludwig, M. & Reutter, H. (2011). De novo duplication of 18p11.21-18q12.1 in a female with anorectal malformation. *Am. J. Med. Genet. A* 155, 445–449.
- Schramm, C., **Draaken, M.**, Bartels, E., Boemers, T.M., Aretz, S., Brockschmidt, F.F., Nöthen, M.M., Ludwig, M. & Reutter, H. (2011). De novo microduplication at 22q11.21 in a patient with VACTERL association. *Eur. J. Med. Genet.* 54, 9–13.
- Ching, B.J., Wittler, L., Proske, J., Yagnik, G., Qi, L., **Draaken, M.**, Reutter, H., Gearhart, J.P., Ludwig, M. & Boyadjiev, S.A. (2010). p63 (TP73L) a key player in embryonic urogenital development with significant dysregulation in human bladder exstrophy tissue. *Int. J. Mol. Med.* 26, 861–867.
- Bogdanović, R., **Draaken, M.**, Toromanović, A., Djordjević, M., Stajić, N. & Ludwig, M. (2010). A novel CLCN5 mutation in a boy with Bartter-like syndrome and partial growth hormone deficiency. *Pediatr. Nephrol.* 25, 2363–2368.
- Reutter, H., Rüschenhoff, F., Mattheisen, M., **Draaken, M.**, Bartels, E., Hübner, N., Hoffmann, P., Payabvash, S., Saar, K., Nöthen, M.M., Kajbafzadeh, A.M. & Ludwig, M. (2010). Evidence for linkage of the bladder exstrophy-epispadias complex on chromosome 4q31.21-22 and 19q13.31-41 from a consanguineous Iranian family. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 88, 757–761.
- Draaken, M.\***, Proske, J.\*, Schramm, C., Wittler, L., Bartels, E., Nöthen, M.M., Reutter, H. & Ludwig, M. (2010). Embryonic expression of the cysteine rich protein 61 (CYR61) gene: A candidate for the development of human epispadias. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 88, 546–550.
- Draaken, M.\***, Reutter, H.\*, Schramm, C., Bartels, E., Boemers, T.M., Ebert, A.-K., Rösch, W., Schröder, A., Stein, R., Moebus, S., Stienen, D., Hoffmann, P., Nöthen, M.M. & Ludwig, M. (2010). Microduplications at 22q11.21 are associated with non-syndromic classic bladder exstrophy. *Eur. J. Med. Genet.* 53, 55–60.
- Besbas, N., **Draaken, M.**, Ludwig, M., Deren, O., Orhan, D., Bilginer, Y. & Ozaltin, F. (2009). A novel CLCN7 mutation resulting in a most severe form of autosomal recessive osteopetrosis. *Eur. J. Pediatr.* 168, 1449–1454.

\* Autoren mit geteilter Erstautorenschaft.

## Anhang

Es werden alle Oligonukleotidsequenzen für die unterschiedlichen qPCR-Experimente und die verwendeten Oligonukleotide der jeweiligen Sanger Sequenzierungen aufgeführt.

### Oligonukleotide für die CNV-Validierung mittels qPCR

Für die Validierung der putativen CNVs und der Segregationsüberprüfung wurden Oligonukleotide designt (Kapitel 3.2.8.1). Die folgenden Tabellen führen neben der Sequenz die genomische Position des zu überprüfenden CNVs in hg18 sowie den Patienten auf.

**Anhang A: House Keeper Gene für die qPCR**

Patient	genomischePosition	Name	Sequenz
HKG	chr7:117019474-117019612	CFTR-f	GGAGATGCTCCTGTCTCCTG
HKG	chr7:117019474-117019612	CFTR-r	GGGAGTCTTTGCACAATGG
HKG	chr15:81722832-81722957	BCN1-r	GCAGATGTCACACTGGAAGC
HKG	chr15:81722832-81722957	BCN1-f	TCAGTGCTTTGTCCAACAGG
HKG	chr10:15185738-15185866	RNA-f	CTGCCATGATCACCTCACAC
HKG	chr10:15185738-15185866	RNA-r	GAACGCCAAGGCTAGAACAC

**Anhang B: qPCR-Primer Duplikation 19**

Patient	genomische Position	Name	Sequenz
275_501	chr19:14944640-15888067	A_ILVLB_1F	TGAAACAGCCTCCTGTCTCCTC
275_501	chr19:14944640-15888067	A_LVLB_1R	GGCTGGACACAGATTTCTCG
275_501	chr19:14944640-15888067	A_AKAP8_2F	GTAGCTGTAGGTTGCGCCTG
275_501	chr19:14944640-15888067	A_AKAP8_2R	CTCGTGGCTGCTGAAGTCT
275_501	chr19:14944640-15888067	A-CYP4F11_3F	AGGCACTGAGCTCCAAGATG
275_501	chr19:14944640-15888067	A-CYP4F11_3R	CTAGCTGCTGGTGAGAGGTG
28_501	chr4:129993331-130147254	B_PHF17_1F	GTGTCACACATTCCCAGCAG
28_501	chr4:129993331-130147254	B_PHF17_1R	CGCAGGAAAGGAAAATGAAG
28_501	chr4:129993331-130147254	B_SLCT1_2F	TCTTGCTGAAGTTTTCAGCCTTTG
28_501	chr4:129993331-130147254	B_SLCT1_2R	GCTCCTCAGAAGAAATATCACG
28_501	chr4:129993331-130147254	B_SLCT1_3F	TGCAGCATGCTTATTGTTGA
28_501	chr4:129993331-130147254	B_SLCT1_3R	CAACAACTGACCAAACTTCA
556_501	chr6:44889986-45230225	C_SUPTH3_1F	ACTGTGAATGGGGAAAGTGG
556_501	chr6:44889986-45230225	C_SUPTH3_1R	GTGTTTTTCTGTGCGCAGAGC
556_501	chr6:44889986-45230225	C_SUPTH3_2F	TGTGAGCCTCAACACCACAG
556_501	chr6:44889986-45230225	C_SUPTH3_2R	GGAAAAACCGTCTCTTTTG
556_501	chr6:44889986-45230225	C_SUPTH3_3F	CCCAATGGAAAATAACCCATC
556_501	chr6:44889986-45230225	C_SUPTH3_3R	CCAACACTAATCTGGACAACAAG



Patient	genomische Position	Name	Sequenz
19_501	chr7:6557534-7376916	D_ZDHC4_1F	CTGCAGTGAGTGTGGCTCTC
19_501	chr7:6557534-7376916	D_ZDHC4_1R	CACCATATCTGGGGGTGAAC
19_501	chr7:6557534-7376916	D_mitte_2F	TGAATTTGGATCCTGTTTTCTC
19_501	chr7:6557534-7376916	D_mitte_2R	TTTTGTGCAGCCAAACACC
19_501	chr7:6557534-7376916	D_COL28A1_3F	CCTGAGCCATTACAGCCACT
19_501	chr7:6557534-7376916	D_COL28A1_3R	ATGTTTGAAGCCTTGAAGC
273_501	chr19:531164-589853	E_BSG_1F	GGAGAAGTTGTTGGCCTGAG
273_501	chr19:531164-589853	E_HCN_2F	AGATGTCGCCAATACGGTGT
273_501	chr19:531164-589853	E_POLRMT_3F	ATCTCCACTGCCACATTCTG
273_501	chr19:531164-589853	E_BSG_1R	AGAGAGAGGAGCCTGGAACC
273_501	chr19:531164-589853	E_HCN_2R	CCCAGTTTCCTCGTCTGAG
273_501	chr19:531164-589853	E_POLRMT_3R	CTCTCATGTCTCGCCTTCT
275_501	chr17:69345767-70130820	Dup17_1F	GGGTTACCTTGAGCAGGTTG
275_501	chr17:69345767-70130820	Dup17_1R	GCTTTCAGGGCTGTCTATGC
275_501	chr17:69345767-70130820	Dup17_ttyh2_2F	CTTGGAAGGATGGACGAGAG
275_501	chr17:69345767-70130820	Dup17_ttyh2_2R	CGACTGGAAGAGAGCAGAGG
275_501	chr17:69345767-70130820	Dup17_CD300_3F	CCTTGTTCCCTTGTCCAGTC
275_501	chr17:69345767-70130820	Dup17_CD300_3R	GGTCCTGGATTTCATGGTCAC
275_501	chr1:204489704-204583881	K-CTSE_1F	CTCCTTCTTTTGTGCTGGT
275_501	chr1:204489704-204583881	K-CTSE_1R	CAGCTTTCCTACCCCAGAGC
275_501	chr1:204489704-204583881	K-CTSE_2F	CTGTGCCATTCTCCTGTTCTC
275_501	chr1:204489704-204583881	K-CTSE_2R	TCTGCATCCACAAAGGTCTG
275_501	chr1:204489704-204583881	K-CTSE_3R	AGGACTTCGTGGATGGAATG
275_501	chr1:204489704-204583881	K-CTSE_3F	CAGTCCCACACGGTTATTCC
78_501	chr1:103221923-103317515	L-COL11A1_1F	GTTGTCCAAGTCATGATCAGC
78_501	chr1:103221923-103317515	L-COL11A1_1R	GATGGTGTAACAAGCTGTG
78_501	chr1:103221923-103317515	L-COL11A1_2F	GGTCTTGTGCTCCTCACCTC
78_501	chr1:103221923-103317515	L-COL11A1_2R	CCAAGGCAGCATATGACTACTG
78_501	chr1:103221923-103317515	L_COL11A1_3F	GTTGTTAACCCAGTTCATCTG
78_501	chr1:103221923-103317515	L_COL11A1_3R	GGAATCACGGTTTTTGAAC
78_501	chr3:166197226-166260487	M-SI_1F	GTCCCATCGTGCATAGTTGT
78_501	chr3:166197226-166260487	M-SI_1R	GCATTGCAGAAGACAACCTGG
78_501	chr3:166197226-166260487	M-SI_2F	CATGACTGGATGGCCAATTAC
78_501	chr3:166197226-166260487	M-SI_2R	CCAGAAGTTGCAACAAAGC
78_501	chr3:166197226-166260487	M_SI_3F	CACGCACATCCACAGAACT
78_501	chr3:166197226-166260487	M_SI_3R	GTGTGGATAAATGAGTCAGATGG
78_501	chr4:64825305-64882812	N-TECRL_1F	CTGGCAGTGTTTGTGTCATG
78_501	chr4:64825305-64882812	N-TECRL_1R	CCTGTTAAAGCCACAAATGAAC
78_501	chr4:64825305-64882812	N-TECRL_2F	TTTTAGGTTGGTCCTTTAGTACGG
78_501	chr4:64825305-64882812	N-TECRL_2R	TGGGGATTTACTTCTTGGATTG
78_501	chr4:64825305-64882812	N_TECRL_3F	TCTAGCTGCAGACCAACTCG
78_501	chr4:64825305-64882812	N_TECRL_3R	GGTCTTCCCATGGAAACAGTTAG
78_501	chr7:134371537-134423024	O- ABL3_1F	CAGCAACGAATCTTCCCACT
78_501	chr7:134371537-134423024	O- ABL3_1R	GGGCCATTCTGCTATCTCAC
78_501	chr7:134371537-134423024	O- ABL3_2F	CATAGCAAGCCACCAAAATG
78_501	chr7:134371537-134423024	O- ABL3_2R	CTCCTGGGGGAAAATTCTG

Patient	genomische Position	Name	Sequenz
78_501	chr7:134371537-134423024	O- ABL3_3F	GGAAATATACCCCATTTTCATGTTG
78_501	chr7:134371537-134423024	O- ABL3_3R	CATCAGAATTTGATTGTGTGTGTC
245_501	chr10:96393482-96511062	Q- CYP2C18_1F	CGGTGGCTAAGTTTTTCAGG
245_501	chr10:96393482-96511062	Q- CYP2C18_2F	TTTCCTCTGAAGCCACCATT
245_501	chr10:96393482-96511062	Q_ CYP2C18_3F	GGAGCAGAACTGGAACACCT
245_501	chr10:96393482-96511062	Q- CYP2C18_1R	GGGTGAAGGTATCCGCTTTC
245_501	chr10:96393482-96511062	Q- CYP2C18_2R	CATTCCATGGGCAATTTTCAT
245_501	chr10:96393482-96511062	Q_ CYP2C18_3R	CTTGGTCCCTGACTCACGTAAC
21_501	chr10:34423178-34757809	R-PARD3_1F	GCCTCCCTTTCTCAGGAGTC
21_501	chr10:34423178-34757809	R-PARD3_1R	AGAAAGTCCAGGACCCAG
21_501	chr10:34423178-34757809	R-PARD3_2F	TGGCTGATCAGTTAAAGAATACC
21_501	chr10:34423178-34757809	R-PARD3_2R	CGACATTGTCTAAAGTAACATCCTG
21_501	chr10:34423178-34757809	R-PARD3_3F	ATCTCTCCCAATTCCTG
21_501	chr10:34423178-34757809	R-PARD3_3R	GTTGGGCTCTTTGCATTGTC
553_501	chr22:32288689-32428417	S-LARGE_1F	CAATGTCAGTGGCAAAGGTG
553_501	chr22:32288689-32428417	S-LARGE_1R	TTCTTGATCCCCAATAAAC
553_501	chr22:32288689-32428417	S-LARGE_2F	CAGGCAAGATATCCTTCCACA
553_501	chr22:32288689-32428417	S-LARGE_2R	CGCCTTTGCCTACATTGAAC
553_501	chr22:32288689-32428417	S-LARGE_3F	GATTAGGCACTGGTCTCCA
553_501	chr22:32288689-32428417	S-LARGE_3R	TTTAACCCATGCCCTGAATC

## Anhang C: qPCR-Primer ALDH1A2

Patient	genomische Position	Name	Sequenz
771-501	chr15:56043964-56082908	1P-F_ RI1-771-ALDH1A2	CTTTTGCTCCAAGTTCCAG
771-501	chr15:56043964-56082908	1P-R_ RI1-771-ALDH1A2	GTCTCACCTGCAGGATTTGC
771-501	chr15:56043964-56082908	2P-F_ RI1-771-ALDH1A2	AGTCAGAAGCACTCCGAAG
771-501	chr15:56043964-56082908	2P-R_ RI1-771-ALDH1A2	AGCTTTGTGCTGTGGCAATA
771-501	chr15:56043964-56082908	3P-F_ RI1-771-ALDH1A2	CAGTGCTACACGGGATGCTA
771-501	chr15:56043964-56082908	3P-R_ RI1-771-ALDH1A2	GCAGACTCTCTGGTCCCATC

## Anhang D: qPCR-Primer VATER/VACTERL Assoziation

Patient	genomische Position	Name	Sequenz
424-501	chr1:215945774-216077064	1P-F_SPATA17	ATGGTTTTGATGCAGGAAGG
424-501	chr1:215945774-216077064	1P-R_SPATA17	TGCTTTGTGCTGAGGAGGTA
424-501	chr1:215945774-216077064	2P-F_SPATA17	CCCTTCAGAAAAGAGCCTGA
424-501	chr1:215945774-216077064	2P-R_SPATA17	GCCAATCAGTAAGGCTGGTG
424-501	chr1:215945774-216077064	3P-F_SPATA17	AAAGATGGTGCTGCTGACCT
424-501	chr1:215945774-216077064	3P-R_SPATA17	GGTCATATGCCAAAGCCAAT
424-501	chr1:215945774-216077064	4P-F_SPATA17	TGTTTGCCCTAGATGTGCAG
424-501	chr1:215945774-216077064	4P-R_SPATA17	TCAGGGATCACATTGGGACT
707-501	chr2:241202666-241227781	1P-F_GPR35	CCGACATACCTGTTGGGTTC
707-501	chr2:241202666-241227781	1P-R_GPR35	CAGCCATACAGGCTGGACTT
707-501	chr2:241202666-241227781	2P-F_GPR35	CCTTGGGAGAGATGCTGAGT
707-501	chr2:241202666-241227781	2P-R_GPR35	TGACCCAATAACCCCACTTC

Patient	genomische Position	Name	Sequenz
707-501	chr2:241202666-241227781	3P-F_GPR35	AGACCCGCATCTACATGACC
707-501	chr2:241202666-241227781	3P-R_GPR35	AGGTAGATGCCCTGGGAGAG
415-501	chr8:145012210-145132100	1P-F_EPPK1	ATGGCCTCAGAGAAGAGCAG
415-501	chr8:145012210-145132100	1P-R_EPPK1	GGACCCCCATTCAATCAAGTA
415-501	chr8:145012210-145132100	2P-F_EPPK1	CACTCTCTCCTGCCCTTCAG
415-501	chr8:145012210-145132100	2P-R_EPPK1	CGCAGAGAAGGACTCAGGAC
415-501	chr8:145012210-145132100	3P-F_EPPK1	GCTCTGCCGTGAAGTATTCC
415-501	chr8:145012210-145132100	3P-R_EPPK1	GGGGAGCTGGTCTACACTGA
415-501	chr8:145012210-145132100	4P-F_EPPK1	AGAGCCCATTGTACAGTCC
415-501	chr8:145012210-145132100	4P-R_EPPK1	AGCTGGCTGAGAACACCAGT
895-501	chr13:99598304-99608944	1P-F_PCCA	GACTGGCCGGGTTATGTAAG
895-501	chr13:99598304-99608944	1P-R_PCCA	CCTTCTGATGTCCTTCAATGC
895-501	chr13:99598304-99608944	2P-F_PCCA	GGATGAGGCTGTCTGTGTTG
895-501	chr13:99598304-99608944	2P-R_PCCA	TCATTTCAGACTCACAGCTTGG
895-501	chr13:99598304-99608944	3P-F_PCCA	CAGGTTATGGATTCTTTTCAGA
895-501	chr13:99598304-99608944	3P-R_PCCA	CCACATTTACAAAGCCATGC
391-501	chr8:62342019-62369981	1P-F_CLVS1	TTGTTTCACAGTGGGAATGGA
391-501	chr8:62342019-62369981	1P-R_CLVS1	TTACTCTGGCCATGGGCTAT
391-501	chr8:62342019-62369981	2P-F_CLVS1	GGGAAAGCTAGGCTCCGTAT
391-501	chr8:62342019-62369981	2P-R_CLVS1	ATCCCCTATTCTGGCAGGTT
391-501	chr8:62342019-62369981	3P-F_CLVS1	TCAGATTTGGAAGGCGAGAT
391-501	chr8:62342019-62369981	3P-R_CLVS1	AGCCTGGCAGAATGGAGTTA

### Verwendete Oligonukleotide für die Sanger Sequenzierung

Die DNA-Amplifikation erfolgte nach den PCR-Reaktionsansätzen (Kapite 3.2.7.1) und -bedingungen (Kapitel 3.2.7.2) für die jeweils verwendete *Taq*. Für abweichende PCR-Reaktionsbedingungen ist die spezifische Annealing-Temperatur bzw. Elongationszeit primerspezifisch entsprechend aufgeführt.

Anhang E: Primer und Reaktionsbedingungen für *ALDH1A2*

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
1	1F-ALDH1A2	1	GCCCCAGCTTGACACCTG	311	TD100	VWR	SE50
	1R-ALDH1A2		CCCTCACCCGCTGAAGAG				
2	2F-ALDH1A2	2-3	TTCCTAAATTGGCGTTGAGTC	1271	TD100	VWR	SE50
	3R-ALDH1A2		TACCATCCCCTCTGTTCTG				
4	4F-ALDH1A2	4	ATTCCATTTCTCAGCAGGGGTC	807	TD100	VWR	SE50
	4R-ALDH1A2		ATTAAGTGGCATGCCCTGTAC				
5	5F-ALDH1A2	5	GCAGCCACCAAAGTTCTCC	230	TD100	VWR	SE50
	5R-ALDH1A2		AACACACATCGCTGAGGACC				
6	6F-ALDH1A2	6-7	TCACAGTGGGATTTCTTTTGG	745	TD100	VWR	SE50
	7R-ALDH1A2		CCTTTGTGGGCTTGGGTAC				
8	8F-ALDH1A2	8	TGATGACAAGAGCTGGGTTG	468	TD100	VWR	SE50
	8R-ALDH1A2		AACATCACAGATTCAAAATGGC				

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
9	9F-ALDH1A2	9	GAAGTAGTTGCATTCCCAATCCA	492	TD100	VWR	SE50
	9R-ALDH1A2		CTCTCTGGCTCCATTTCCAGC				
10	10F-ALDH1A2	10	TTAGCCAGTGTCTCCATCATTTTG	676	TD100	VWR	SE50
	10R-ALDH1A2		GCACATAGCATGTCACCTGGC				
11	11F-ALDH1A2	11-12	TGGAATCAAGTGATGCTGGAG	1067	TD100	VWR	SE50
	12R-ALDH1A2		AGGACCCGAGCAGTCAAAAT				
13	13F-ALDH1A2	13	ATGAACATCCCAGGACTTGC	368	TD100	VWR	SE50
	13R-ALDH1A2		TGTACCCAGCTGGTTTGCTT				
PolyA	13-F-PolyA-ALDH1A2	PolyA	TGAATGCTGCCCTCTGTAG	273	TD100	VWR	SE50
	13-R-PolyA-ALDH1A2		TGCTCAGTTACCCAAGAGGG				

#### Anhang F: Primer und Reaktionsbedingungen für rs3208837 (*TTL3*)

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
1	1F-ALDH1A2	11	GGGCTAGCAATTCCTGGAGCT	515	60 °C / 1 min	VWR	SE50
	1R-ALDH1A2		ATCCCACTCCCAGAGATTGGG				

#### Anhang G: Primer und Reaktionsbedingungen für *CYR61*

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
1	1F-CYR61	1-3	ACACCAGCTTGTGGCGTCT	1452	59 °C / 2:30 min	VWR	SE50
	3R-CYR61		CGACACAAACAGGCTCAAGC				
2	3F-CYR61	3-5	GAGTTTCAGGCGGTGGTTTG	1288	59 °C / 2:30 min	VWR	SE50
	5R-CYR61		AGTCCCATCACCCACACCAC				

#### Anhang H: Primer und Reaktionsbedingungen für *WIZ*

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
1	WIZ-2F2	2	GGGAACTGAGGCAGATTCCC	409	TD100+4	VWR	SE50
	WIZ-2R2		CTGCGCTGGGTGACTTGACT				
2	WIZ-3F	3	GCACTTCCTTGACGTGCTG	2270	TD100+4	VWR	---
	WIZ-3R		TCTCTCAGGAGCAGAGGCC				
	WIZ-3R2*	3	CTGAGCAGGCTCTCGCTGG	---	---	---	SE50
	WIZ-3F2*		GAGCCTTTTGGAGGCAGCAG				
3	WIZ-3R3*	3	CAGGTCCGCAGGGGGCTC	---	---	---	SE50
	WIZ-3F3*		AGCATCCACCCCTACTCCT				
	WIZ-4F	4	GGTGAAGCCCTGAATATGGG	511	TD100+4	VWR	SE50
	WIZ-4R		TGCTTCCAGGAAAGCTGAGC				
4	WIZ-5F	5	GCCTGGGTGAGTGGGACTC	667	TD100+4	VWR	SE50
	WIZ-5R		ACAGCCCAACCTGAGGTCC				
5	WIZ-6F	6	CCAGCCGACCAGGACACTC	711	TD100+4	VWR	SE50
	WIZ-6R		ACTCTGGATACCCCAAGGG				
6	WIZ-7F	8	CCCTACCCTGGATCCCCTG	632	TD100+4	VWR	SE50
	WIZ-7R		GTCAGTGTGCACGCTGTGG				
7	WIZ-8F	8-9	CAGGGCCATCTGGGTGCAC	1008	TD100+4	VWR	SE50
	WIZ-9R		CCCAGCTTCCACCAACCCT				
8	WIZ-10F	10	AGCAGCAGGTGTGCCAGG	374	TD100+4	VWR	SE50
	WIZ-10R		GCCGGTTTGAGGTTTTGGCTT				

\* ausschließlich Sequenzierungsprimer

**Anhang I: Primer und Reaktionsbedingungen für *SNP29* und *CRKL***

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
1	1F-SNP29	1	AAGGAGTTCGCGCGACGAC	556	58 °C / 1 min	VWR	SE50
	1R-SNP29		GATTTCTGGGGTAAACTGCCCT				
2	2F-SNP29	2	TACCCGTCTCCAGATGTGCC	421	60 °C / 1 min	VWR	SE50
	2R-SNP29		GGTTGTTGGATCCCTTCATGG				
3	3F-SNP29	3	GTTTGGCACAGAGGAGGCAT	305	57 °C / 1 min	VWR	SE50
	3R-SNP29		CCCCAGAGAGGTTGCCACT				
4	4F-SNP29	4	GGATAGCCTCAGAACCAACCC	329	63 °C / 2:30 min	VWR	SE60
	4R-SNP29		TGAGGGAAGTGAAGCTGGAGG				
5	5F-SNP29	5	CAGGCAACACAGATCCCTGTC	520	60 °C / 1 min	VWR	SE50
	5R-SNP29		CAGGGCCAGGCTACTGTGC				
6	1F2-CRKL	1	CTCGAGGTGTGCGAGAGGC	418	59 °C / 1 min	VWR	SE50
	1R2-CRKL		TCGACAGACCCGGTTCTCG				
7	2F-CRKL	2	CGACAAGAGCAAACTTGTCTC	713	58 °C / 1 min	VWR	SE50
	2R-CRKL		CATCCAGTGCTCTAATCCATG				
8	3F-CRKL	3	GTATGGGCCCTTTGGATAAGG	367	59 °C / 1 min	VWR	SE50
	3R-CRKL		TGCGACTGCCAGTCTGCAG				

**Anhang J: Primer und Reaktionsbedingungen für ausgewählte Gene der WNT- und FGF-Signalwege**

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
1	FGFR2-2F	2	GGGAAGATTCCCTGACTCG	416	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-2R		TCTGGTGCTCTTAGAAGCCC				
2	FGFR2-3F	3	GGGAGAGGTGGATGCCTG	571	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-3R		TTTCTGGTGACACCAGGTCC				
3	FGFR2-4F	4	GGGTTCTGGGTTGTTGAC	284	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-4R		AGCATGGCGCAGAAGAGTC				
4	FGFR2-5F	5	TCATGGAGGGGAAGCTGTC	474	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-5R		AAACCCCGTCTCTGCTACAG				
5	FGFR2-6F	6-7	TACCTTTCTTGCCCTCTTCAG	551	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-7R		CTGTACCCTTTTCACTGCC				
6	FGFR2-8F	8	TGAGGCTTTTCTGGCATGAG	356	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-8R		CAAACCCATGAAGGAGACCC				
7	FGFR2-9F	9	TGCCGCTGTTTAGACGTAATG	353	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-9R		TGCCTGCAGTCTCCCAAAG				
8	FGFR2-10F	10	ACGCCTTGTTGCCACAG	331	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-10R		TTATGCAAGGATAAAAGGGGC				
9	FGFR2-11F	11	TTCCTTTGGTTGTGCTATGATG	443	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-11R		AACACTAACTGGGTGACCGC				
10	FGFR2-12F	12	GATTCGATACTCTGGCTGGG	364	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-12R		CTCCTGCTGACATCATCACAC				
11	FGFR2-13F	13	ACTCCATGCTTTAGTAAGCCG	369	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-13R		CGAAAACCTCTCAACCCCTAG				
12	FGFR2-14F	14	AGGCCTTTGTCCCTTCCTC	368	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-14R		TGGGAGCAGGATCTGGAAG				
13	FGFR2-15F	15	GAATTGCCCAAGGGGAGAC	350	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-15R		GGCTTGATCTAGCAAATGAGC				
14	FGFR2-16F	16	CCCGGCCACACTGTATTTTC	370	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-16R		ATCCACCCAGCTCTCAAC				
15	FGFR2-17F	17	TGGTCCTCATTGGGACTGAT	274	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-17R		AGTATTTTGCAGCTCAAGCC				
16	FGFR2-18F	18	AGGAACTGCAGGAGGGCC	372	TD100	VWR	SE50
	FGFR2-18R		ATGTTTAGGAAACCAGGGGC				

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
17	FGFR2-19F FGFR2-19R	19	AGTGCCTTTCGGAGGAACTG CTCCAACCAACAGCCAACAG	391	TD100	VWR	SE50
18	FGFR2-20F FGFR2-20R	20	GTGGCCTGTGCTGGATAAAG TTTCAGTATCAACGGACCCAC	651	TD100	VWR	SE50
19	FGFR2-21F FGFR2-21R	21	GTGGGCTGGGTCTCTGTTC CTGGGAGGCATGGTCTCC	447	TD100	VWR	SE50
20	FGF10-1F FGF10-1R	1	GTTGGTGCATTCACTTCTGG GTTGGGGGGTGAATTAGTGT	633	TD100	VWR	SE50
21	FGF10-2F FGF10-2R	2	GCCGGGTTTTAAGACACATTG GAATTGGAAGAGCTGCTTTC	452	TD100	VWR	SE50
22	FGF10-3F FGF10-3R	3	TCTGGATGGCTTGTATCAAATG CGTGTCTTTGCCTTCAATCT	370	TD100	VWR	SE50
23	WNT5A-2F WNT5A-2R	2	GCTTCAGCTCCGGTTCAGT TGGAGTTCCAGCTTCTTCAGG	294	TD100	VWR	SE50
24	WNT5A-3F WNT5A-3R	3	AACTCACGGAGGAGAAGCG TTTCCCATTCCCTAGGAGCT	479	TD100	VWR	SE50
25	WNT5A-4F WNT5A-4R	4	ACTTTGTCATGAGGACAAGCAG GAAGGCATCCTCCTTCATGC	490	TD100	VWR	SE50
26	WNT5A-5F WNT5A-5R	5	CCCCTCCATCTCTACCTTGC GACGGGAACAGGATGAGGAG	631	TD100	VWR	SE50
27	WNT5A-6F WNT5A-6R	6	ACAGTCCTTAATTCAGCTGGG ACCTACCCATCCCATATGATG	967	TD100	VWR	SE50
28	WNT3A-1F2 WNT3A-1R2	1	CCGCAGGAGGGCCAGCG TGGAGCAGAAGGGCGCGGG	290	TD100	VWR	SE50
29	WNT3A-2F WNT3A-2R	2	ATGGTGGAAGCTGCGTCTC GTAAGCGGGAAGGACCCC	500	TD100	VWR	SE50
30	WNT3A-3F WNT3A-3R	3	TTTGCTTATACACCAACCAAC TCGAGAAGACCCTCAGCCTG	519	TD100	VWR	SE50
31	WNT3A-4F WNT3A-4R	4	GCTTTATGGAGCAGGTAGGCT GTCAGGTGGGTGGTCAAACC	1554	TD200	VWR	SE50
32	WNT11-1F WNT11-1R	1	CCGACCCCTCCTTTGTAATTT AGGAAACAGAGGCTGAGGGA	413	TD100	VWR	SE50
33	WNT11-2F WNT11-2R	2	CAGGAGGCAAAGTCCATTGAG CCATCCCTCCATCTAAACACAC	439	TD100	VWR	SE50
34	WNT11-3F WNT11-3R	3	TCTCAATGGCCCTAGTGCC AGGATGAGGATGGTGCGAG	562	TD100	VWR	SE50
35	WNT11-4F WNT11-4R	4	CAGCAGGCAGTGACTCCCT GAGCAGGTCTCCATTCCC	527	TD100	VWR	SE50
36	WNT11-5F WNT11-5R	5	TAAGAAGGGCTGAGTCGGTG CCGCAGAACATTCTGAAGAAG	671	TD100	VWR	SE50
37	DACT1-1F2 DACT1-1R2	1	GCAGCCCTAGCGCCCTGCT AACAGCCGTGCTCCACCTTC	452	TD100	VWR	SE50
38	DACT1-2F DACT1-2R	2	CTCAGTCCATTTTCTTGTCCT CTGCACTGGAAACAACTCCAT	547	TD100	VWR	SE50
39	DACT1-3F DACT1-3R	3	AGGACACCAAAGTCCAATGAAT TAACCAAGTAGCACCCAAAGG	508	TD100	VWR	SE50
40	DACT1-4F DACT1-4R	4	TCCTTGCAATCTCTTTTACC TTCCATTAAAGGCACTAGCATC	2166	TD200	VWR	SE50
41	1F-T_Gen 2R-T_Gen	1-2	GGGAAGGTGGATCTCAGGTAG GAAGGCTGTGGCAGTTTCTC	1202	58 °C / 3 min	Roche	SE50
42	3F-T_Gen 5R-T_Gen	3-5	CCAGAGGACTTTCTGCATCC GCAGAGGTTAGATGGGCAAC	1513	58 °C / 3 min	Roche	SE50
43	6F-T_Gen 6R-T_Gen	6	TTGTGAGGCAGACTGTGTCC GCAGTGGCGGAGACATAAAT	684	58 °C / 1:30 min	VWR	SE50

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
44	7F-T_Gen	7	TCTTGCCCCTGATAACCATG	468	58 °C / 1:30 min	VWR	SE50
	7R-T_Gen		GCAATCCCTGGGCATAGCT				
45	8F-T_Gen	8	CACTCCGAATGGGATTTCTG	464	58 °C / 1:30 min	VWR	SE50
	8R-T_Gen		CCTGAGACTGCCACTGGGTA				

#### Anhang K: Primer und Reaktionsbedingungen für *CHRM3*

Produkt	Primer	Exon	Sequenz	Größe	PCR	Taq	CS
1	CHRM3-Ex5-1-F	5	GGCCTTCCATGTCTTTTAACG	496	59 °C / 1 min	Qiagen	SE50
	CHRM3-Ex5-1-R		TGTAGGTCGTAAACAGATTCATTG				
2	CHRM3-Ex5-2-F	5	GACCATCATCGGCAACATC	558	59 °C / 1 min	Qiagen	SE50
	CHRM3-Ex5-2-R		CCAGCAAGCTCTTTGGTACG				
3	CHRM3-Ex5-3-F	5	CGGGAGAGTGCTTCATTGAG	494	59 °C / 1 min	Qiagen	SE50
	CHRM3-Ex5-3-R		CTTGGTGGAGTTGAGGATGG				
4	CHRM3-Ex5-4-F	5	TTGGAACAACAATGATGCTG	500	58 °C / 1 min	Qiagen	SE50
	CHRM3-Ex5-4-R		TGATGATGAAGGCAAGCAAG				
5	CHRM3-Ex5-5-F	5	TCTGGCCAAGAGGTTTGC	491	58 °C / 1 min	Qiagen	SE50
	CHRM3-Ex5-5-6		CCATTTTATCATCACCAGAAGTC				

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus M. Nöthen, der mir dieses äußerst interessante Thema überlassen und meine Arbeit stets durch Ratschläge, Hilfestellungen und fachliche Diskussionen unterstützt hat. Zudem möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Labormittel, den Arbeitsplatz und letztendlich für die Begutachtung dieser Dissertation bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Hoch gilt ebenfalls mein besonderer Dank für das Interesse an dieser fakultätsübergreifenden Thematik und für die intensive Begutachtung der Dissertation.

Bei den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission, Herrn Prof. Dr. Joachim L. Schultze und Herrn Prof. Dr. Sven Perner, bedanke ich mich für das Interesse und die Begutachtung der Arbeit.

Ich möchte mich ganz besonders herzlich bei Herrn Prof. Michael Ludwig und Herrn PD Dr. Heiko Reutter bedanken. Sie haben mich in die Arbeitsgruppe CURE-Net fachlich wie auch menschlich herzlich aufgenommen, hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme und brachten mich durch zahlreiche fachliche Diskussionen Schritt für Schritt weiter. Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch für das in mich gesetzte Vertrauen, neben der Wissenschaft, den Laborablauf koordinieren und die Studenten betreuen zu dürfen.

Herzlich danke ich den im Projekt direkt involvierten weiteren CURE-Net-Teammitgliedern: Pia Uerdingen, Enrika Bartels, Charlotte Schramm, Friederike Baudisch, Wiebke Prinz, Claudia Zeidler, Alina Hilger und Sadaf Mughal.

Bei allen Kollegen der Humangenetik im L&B und BMZ bedanke ich mich herzlich für die gute Einarbeitung in diverse Labortechniken, die uneingeschränkte Unterstützung sowie hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen und Ratschläge.

Mein Dank gilt den Projektpartnern für die gute Zusammenarbeit am 1. Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abteilung für Entwicklungsgenetik, Berlin (Prof. Bernhard G. Herrmann, Dr. Lars Wittler, Judith Proske und Dr. Tracie Pennimpede); 2. Cologne Center for Genomics (CCG) an der Universität zu Köln (Prof. Peter Nürnberg, Dr. Holger Thiele, Dr. Mohammad R. Toliat, Christian Becker, Dr. Kathryn Konrad und Dr. Janine Altmüller); 3. Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Next Generation



Sequencing Gruppe, Berlin (Dr. Bernd Timmermann, Dr. Heiner Kuhl, Dr. Martin Kerick und Illona Hauenschild); 4. Institut für Klinische Molekularbiologie an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel (Prof. Andre Franke, Britt Petersen und Dr. Abdou ElSharawy). Ich bedanke mich ebenfalls für die gute Kooperation mit Frau Dr. Stefanie Weber (Pädiatrische Nephrologie Universitätsklinikum Essen und Heidelberg), Herrn Prof. Dr. Simeon Boyadjev (UC Davis Kinderklinik, Sacramento, USA), Herrn Prof. Dr. Abdol-Mohammad Kajbafzadeh (Kinderklinik Universität Teheran, Iran) sowie Frau Prof. Dr. Agneta Nordenskjöld (Karolinska Institut und Astrid Lindgren Kinderklinik, Stockholm, Schweden).

Ich danke den Patientenorganisationen "Selbsthilfegruppe Blasenektrophie/Epispadie e. V." (SHG BE e. V.) und "Selbsthilfeorganisation für Menschen mit angeborenen anorektalen Fehlbildungen" (SoMA e. V.) sowie allen anderen beteiligten Patienten und Familien, nicht nur für die Bereitstellung der DNA-Proben sondern ausdrücklich auch für die Teilnahme an dem ganzheitlichen Projekt CURE-Net.

Viele Freunde standen mir motivierend und hilfreich zur Seite. Besonders hervorheben möchte ich Richard Lehmann, Daniela Janzen, Sascha Dick, Almut Molzberger, Oliver Aspelin, Stefan Wahlen, Henning Christiansen, Katharina Verhaelen, Gökçe Göral, Christoph Große Hovest, das Spleen-Team und die DoKo-Runde. Ihr habt mich immer wieder unterstützt und auch für Ablenkung von der Wissenschaft gesorgt, damit ich meine Ziele verfolgen konnte. Euch allen gilt ausdrücklich mein herzlichster Dank!

Meiner gesamten Familie und allen Angehörigen möchte ich besonders herzlich danken. Sie bestärkten mich in meinem Handeln und waren stets ein sicherer Rückhalt.

Zum Schluss danke ich von ganzem Herzen meiner Lebenspartnerin Kathrin Kemmerling für ihre moralische und motivierende Unterstützung, dem Verständnis für meine Forschung und all die wundervollen bisher erlebten gemeinsamen Augenblicke. Es ist großartig dass Du, nicht zuletzt aufgrund meiner Dissertation, Teil meines Lebens geworden bist.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass

1. die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,
2. die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind,
3. die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate,
4. für die Erstellung der vorgelegten Arbeit und/oder die Gelegenheit zur Promotion keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberatern / -vermittlern oder anderen Personen) in Anspruch genommen wurde.

---

Bonn, 25.04.2013